

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Mustapha Ben Boulaid-Batna 2  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie



جامعة باتنة 2  
كلية علوم الطبيعة والحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE DES ORGANISMES

*Laboratoire de Chimie et Chimie de l'Environnement*

*Laboratoire de Biotechnologie des Molécules Bioactives et de la Physiopathologie Cellulaire*

N°...../SNV/2021

## THÈSE

Présentée par

Mme: BOUAFIA Waffa

Pour l'obtention du Diplôme de

## **DOCTORAT TROISIÈME CYCLE (LMD)**

Filière: Sciences Biologiques

**Spécialité: Biologie cellulaire et physiologie animale**

## THÈME

**ÉVALUATION DES ACTIVITÉS BIOLOGIQUES ET  
CARACTÉRISATION PHYTOCHIMIQUE DE LA PLANTE EPHEDRA  
ALTISSIMA DESF.**

Soutenue publiquement le: 14/07/2021

### DEVANT LE JURY

Président	<b>Hambaba Leila</b>	<b>Pr. Université Batna 2</b>
Rapporteur	<b>HABA Hamada</b>	<b>Pr. Université Batna 1</b>
Examineurs	<b>Atmani Djebbar</b>	<b>Pr. Université Bejaia</b>
	<b>Loucif Lotfi</b>	<b>Dr. Université Batna 2</b>
	<b>Benkiki Naima</b>	<b>Dr. Université Batna 2</b>

*Année universitaire : 2020/2021*

# Remerciements

**Je** tiens tout d'abord à remercier Allah le tout puissant, qui nous a donné l'opportunité, la patience, la force et la volonté pour réaliser et accomplir ce travail de recherche.

En seconde lieu, j'aimerais remercier infiniment mon directeur de thèse **Pr Haba Hamada** pour l'encadrement et la direction de cette thèse. Je tiens particulièrement à lui exprimer ma profonde gratitude pour l'ensemble des conseils, orientations et support durant la réalisation de ce projet de recherche.

**J'**exprime ma reconnaissance et mes vifs remerciements au **Pr Hambaba Leila** présidente du Jury, ainsi qu'aux membres du jury, **Pr Atmani Djebbar**, **Dr Loucif Lotfi** et **Dr Benkiki Naima** pour avoir accepté de participer au jugement de cette thèse et qui ont bien voulu réserver une part de leurs temps pour évaluer ce travail.

Un vif remerciement au **Dr Mouffouk Soumia**, pour les conseils et efforts fournis pendant la réalisation des essais au sein du laboratoire de chimie et chimie de l'environnement université Batna1, ainsi que pour les différentes précieuses orientations au cours de ce projet de Doctorat.

**Je** profite cette occasion pour exprimer mon éternelle reconnaissance et remerciement à ma famille pour l'encouragement et le soutien durant la réalisation du projet de doctorat.

En fin, je tiens à remercier toute personne qui a participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

# Dédicace

Je dédie ce travail a :

Mes chers parents pour leurs sacrifices

Ma petite famille; époux et mes enfants pour la patience et l'encouragement

Ma grande famille pour le support et le soutien

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

**Introduction..... 1**

## **Chapitre I : Synthèse bibliographique**

<b>I.1. Généralités sur la famille Ephedraceae.....</b>	<b>4</b>
I.1.1. Présentation du genre <i>Ephedra</i> L. ....	4
I.1.1.1. Etymologie.....	4
I.1.1.2. Description botanique du genre <i>Ephedra</i> L.....	4
I.1.1.3. Répartition géographique.....	4
I.1.1.4. Utilisation en médecine traditionnelle.....	5
<b>I.2. Espèce <i>Ephedra altissima</i> Desf. ....</b>	<b>6</b>
I.2.1. Classification systématique.....	6
I.2.2. Répartition géographique .....	6
I.2.3. Noms communs .....	7
I.2.4. Usage traditionnel .....	7
I.2.5. Description botanique.....	7
<b>I.3. Etudes phytochimiques antérieures sur le genre <i>Ephedra</i> L.....</b>	<b>8</b>
I.3.1. Composés isolés des espèce du genre <i>Ephedra</i> L.....	8
I.3.2. Composés isolés de l'espèce <i>Ephedra altissima</i> Desf. ....	14
<b>I.4. Notion de stress oxydatif et de système antioxydant.....</b>	<b>14</b>
I.4.1. Radicaux libres.....	14
I.4.1.1. Sources exogènes des ERO.....	15
I.4.1.2. Sources endogènes des ERO.....	15
I.4.2. Le stress oxydant.....	15
I.4.2.1. Oxydation de l'ADN.....	16
I.4.2.2. Oxydation des protéines.....	16
I.4.2.3. Oxydation des lipides.....	16
I.4.2.4. Oxydation des glucides.....	17
I.4.3. Défense antioxydante .....	17
I.4.3.1. Système enzymatique.....	17

I.4.3.2. Système non enzymatique.....	18
I.4.3.3. Polyphénols comme antioxydants.....	18
<b>I.5. L'inflammation et les anti-inflammatoires.....</b>	<b>18</b>
I.5.1. L'inflammation aigue.....	19
I.5.1.1. Phase vasculaire.....	19
I.5.1.2. Phase cellulaire.....	19
I.5.1.3. Phase de résolution.....	19
I.5.2. L'inflammation chronique.....	20
I.5.3. Les anti-inflammatoires.....	20
I.5.3.1. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens.....	20
I.5.3.2. Les anti-inflammatoires stéroïdiens.....	20
I.5.3.3. Les anti-inflammatoires d'origine végétale.....	21
<b>I.6. Le syndrome métabolique et les enzymes de digestion.....</b>	<b>21</b>
I.6.1. Le syndrome métabolique.....	21
I.6.1.1. L'obésité.....	21
I.6.1.2. Diabète non insulino-dépendant.....	22
I.6.2. Les enzymes de digestion.....	22
I.6.2.1. L' $\alpha$ -amylase pancréatique et l' $\alpha$ -amylase salivaire.....	22
I.6.2.2. L' $\alpha$ -glucosidase.....	23
I.6.2.3. Lipase pancréatique.....	23
I.6.3. Les inhibiteurs de lipase pancréatique et de l' $\alpha$ -amylase.....	23
<b>I.7. Activité antibactérienne.....</b>	<b>23</b>
I.7.1. Généralités sur la thérapeutique des infections bactériennes.....	23
I.7.2. Types de bactéries infectives.....	24
I.7.3. Principales substances antimicrobiennes.....	24
I.7.3.1. Antibiotiques.....	24
I.7.3.2. Les composés phénoliques.....	24
I.7.4. Mécanisme de l'effet antimicrobien.....	25
<b>I.8. Composés polyphénoliques.....</b>	<b>25</b>
I.8.1. Généralités sur les polyphénols.....	25
I.8.2. Flavonoïdes.....	26
I.8.2.1. Classification et structures chimiques.....	27

I.8.2.2. Biosynthèse des flavonoïdes.....	29
I.8.2.3. Caractéristiques physico-chimiques des flavonoïdes.....	32
I.8.2.3.1. Absorption des rayonnements UV.....	32
I.8.2.3.2. Solubilité des flavonoïdes.....	32
I.8.3. Activités biologiques des flavonoïdes.....	32
<b>Chapitre II : Matériel et Méthodes</b>	
II.1. Matériel végétal.....	34
II.2. Préparation des extraits bruts.....	34
II.3. Calcul de rendement.....	34
II.4. Analyse qualitative.....	36
I.4.1. Screening phytochimique.....	36
II.5. Analyse quantitative.....	37
I.5.1. Dosage des polyphénols totaux.....	37
I.5.2. Dosage des flavonoïdes totaux.....	38
I.5.3. Dosage des tanins condensés.....	38
II.6. Activité antioxydante.....	38
II.6.1. Piégeage des radicaux libres DPPH.....	38
II.6.2. Pouvoir réducteur du fer (FRAP).....	39
II.6.3. Capacité antioxydante totale (CAT).....	40
II.6.4. Capacité antioxydante par réduction de permanganate.....	40
II.6.5. Test de blanchissement de la $\beta$ -carotène.....	41
II.6.6. Inhibition de la peroxydation lipidique par la méthode au thiocyanate ferrique (FTC).....	41
II.6.7. Piégeage du peroxyde d'hydrogène.....	42
II.6.8. Activité antioxydante par potentiométrie.....	43
II.7. Activité anti-arthritique.....	43
II.8. Activité inhibitrice de la lipase pancréatique.....	44
II.9. Activité inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase.....	44
II.10. Digestion gastro-intestinale <i>in vitro</i> .....	45
II.10.1. piégeage des radicaux libres ABTS.....	45
II.10.2. Le pouvoir réducteur du fer.....	46
II.11. Activité antibactérienne.....	46
II.11.1. Vérification de la pureté des bactéries.....	46

II.11.2. Préparation de l'inoculum.....	46
II.11.3. Réalisation des tests antibactériens.....	47
II.12. Analyse statistique.....	47
II.13. Méthodes d'investigation phytochimique.....	48
II.13.1. Méthodes chromatographiques.....	48
II.13.1.1. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	48
II.13.1.2. Chromatographie sur couche préparative (CCE) .....	48
II.13.1.3. Chromatographie liquide sous vide (VLC).....	48
II.13.1.4. Chromatographie sur colonne ouverte (CC).....	48
II.13.1.5. Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-ESI-MS/MS).....	49
II.13.2. Méthodes d'identification structurale.....	50
II.13.2.1. Résonance magnétique nucléaire (RMN).....	50
II.13.2.2. Spectrométrie de masse (MS).....	51
II.13.2.3. Spectrométrie UV-Visible.....	51
II.13.3. Analyse chromatographique des extraits.....	51
II.13.4. Etude de l'extrait <i>n</i> -BuOH.....	52
II.13.4.1. Etude de la fraction F <sup>'</sup> -5 (F-4+F-5).....	53
<b>Chapitre III: Résultats et discussion</b>	
III.1. Extraction et calcul du rendement.....	55
III.2. Screening phytochimique.....	55
III.3. Teneur totale en polyphénols, flavonoïdes et tanins condensés.....	56
III.4. Activité antioxydante.....	59
III.4.1. piégeage des radicaux libres DPPH.....	60
III.4.2. Pouvoir réducteur du fer (FRAP).....	63
III.4.3. Capacité antioxydante totale (CAT).....	66
III.4.4. Capacité antioxydante par réduction de permanganate.....	67
III.4.5. Test de blanchissement de la $\beta$ -carotène.....	68
III.4.6. Inhibition de la peroxydation lipidique par la méthode au thiocyanate ferrique (FTC).....	72
III.4.7. Piégeage du peroxyde d'hydrogène.....	74
III.4.8. Activité antioxydante par potentiométrie.....	76
III.5. Activité anti-arthritique.....	76

# SOMMAIRE

---

III.6. Activité inhibitrice de la lipase pancréatique.....	80
III.7. Activité inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase.....	83
III.8. Digestion gastro-intestinale <i>in vitro</i> .....	86
III.9. Activité antibactérienne.....	90
III.10. Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-ESI-MS/MS).....	100
III.10.1. Quantification des composés phénoliques.....	103
III.11. Identification structurale des composés isolés.....	107
III.11.1. Identification structurale du composé A.....	107
III.11.2. Identification structurale du composé B.....	119
<b>Conclusion et perspectives</b> .....	<b>129</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>132</b>
<b>Annexes</b>	

## Liste des abréviations

<b>1D</b>	Monodimensionnel
<b>2D</b>	Bidimensionnel
<b><sup>2</sup>J</b>	Constante de couplage entre deux atomes séparés par 2 liaisons
<b><sup>3</sup>J</b>	Constante de couplage entre deux atomes séparés par 3 liaisons
<b>ABTS</b>	Acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
<b>AcOEt</b>	Acétate d'éthyle
<b>AcOH</b>	Acide acétique
<b>ACTH</b>	Hormone adrénocorticotrophine
<b>AINS</b>	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
<b>AIS</b>	Anti-inflammatoires stéroïdiens
<b>AMC</b>	Amoxicilline + acide clavulanique.
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>BHA</b>	Hydroxyanisole butylé
<b>BHT</b>	Hydroxytoluène butylé
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Chlorure de calcium
<b>CC</b>	Chromatographie sur Colonne ouverte
<b>CCE</b>	Chromatographie sur Couche Epaisse
<b>CCM</b>	Chromatographie sur Couche Mince
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	Chloroforme
<b>CMI</b>	Concentration minimale inhibitrice
<b>COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H</b>	Corrélation spectroscopique <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H (CORrelated SpectroscopY)
<b>D</b>	Dextrogyre
<b><i>d</i></b>	Doublet
<b><i>dd</i></b>	doublet de doublets
<b>DEPT</b>	Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer
<b><i>DI</i></b>	doublet large
<b>DMSO-<i>d</i><sub>6</sub></b>	Diméthylsulfoxyde deutéré
<b>DNID</b>	Diabète non insulino-dépendant
<b>DO</b>	Densité optique
<b>DPPH</b>	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
<b>EC50</b>	Concentration efficace 50
<b>EOA</b>	Espèces oxygénées activées
<b>EP</b>	Ether de pétrole
<b>ERO</b>	Espèces réactives d'oxygène
<b>ESI</b>	Ionisation par électro nébulisation (Electro Spray Ionisation)
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>F</b>	Fraction
<b>FeCl<sub>3</sub></b>	Iron trichloride
<b>Glc</b>	Glucose
<b>GSH</b>	Glutathion
<b>GSSG</b>	Disulfure de glutathione
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peroxyde d'hydrogène
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Acide sulfurique
<b>HCl</b>	Acide chlorhydrique concentré

## Liste des abréviations

<b>HMBC</b>	Corrélation hétéronucléaire à longue distance (Heteronuclear multiple-bond Correlation)
<b>HSQC</b>	Corrélation hétéronucléaire directe (Heteronuclear single quantum correlation)
<b>Hz</b>	Hertz
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentration inhibitrice à 50%
<b>IMC</b>	Indice de masse corporelle
<b><i>J</i></b>	Constante de couplage exprimée en Hz
<b>L</b>	Lévogyre
<b><i>m</i></b>	Multiplet
<b><i>m/z</i></b>	Rapport masse / charge élémentaire de l'ion
<b>MeOH</b>	Méthanol
<b>MeOH-<i>d</i><sub>4</sub></b>	Méthanol deutéré
<b>MS</b>	Spectrométrie de masse (Mass Spectrometry)
<b>NADH</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
<b>NADPH</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
<b><i>n</i>-BuOH</b>	<i>n</i> -butanol
<b>nm</b>	Nanomètre
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	Anion superoxide
<b>OH<sup>•</sup></b>	Radical hydroxyle
<b>p-NPB</b>	p-Nitrophenyl butyrate,
<b>ppm</b>	partie par million
<b>Rha</b>	Rhamnose
<b>RMN</b>	Résonance Magnétique Nucléaire
<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	Résonance Magnétique Nucléaire du carbone 13
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Résonance Magnétique Nucléaire du proton
<b>ROOH</b>	Peroxyde organique
<b>Rp-18</b>	Silice greffée en C-18 (reversed phase silica with C-18 functional groups)
<b><i>s</i></b>	Singulet
<b>sF</b>	sous Fraction
<b>SiO<sub>2</sub></b>	Silice
<b><i>t</i></b>	Triplet
<b><i>tl</i></b>	triplet large
<b>TOCSY</b>	Total Correlation SpectroscopY
<b>TRIS</b>	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
<b>TEAC</b>	Trolox equivalent antioxidant capacity
<b>uma</b>	unité de masse atomique
<b>UV</b>	Ultra-Violet
<b>UV-Vis</b>	UltraViolet-Visible
<b>VLC</b>	Chromatographie liquide sous vide
<b>δ<sub>C</sub></b>	Déplacement chimique du carbone (exprimé en ppm)
<b>δ<sub>H</sub></b>	Déplacement chimique d'hydrogène (exprimé en ppm)
<b>λ</b>	Longueur d'onde en nm

## Liste des Figures

Figure N°	Titre	Page
<b>Figure 1</b>	Répartition géographique des espèces <i>Ephedra</i> dans le monde.....	<b>5</b>
<b>Figure 2</b>	Distribution géographique de l'espèce <i>Ephedra altissima</i> Desf. ....	<b>6</b>
<b>Figure 3</b>	<i>Ephedra altissima</i> Desf. ....	<b>7</b>
<b>Figure 4</b>	Classification des polyphénols.....	<b>26</b>
<b>Figure 5</b>	Structure de base des flavonoïdes (C6-C3-C6).....	<b>27</b>
<b>Figure 6</b>	Biosynthèse des flavonoïdes.....	<b>29</b>
<b>Figure 7</b>	Biosynthèse de l'acide shikimique.....	<b>29</b>
<b>Figure 8</b>	Biosynthèse du <i>p</i> -coumaroyl-CoA.....	<b>30</b>
<b>Figure 9</b>	Biosynthèse du malonyl-CoA.....	<b>30</b>
<b>Figure 10</b>	Schéma récapitulatif de la biosynthèse des différentes classes de flavonoïdes.....	<b>31</b>
<b>Figure 11</b>	Groupements caractéristiques d'un squelette flavonique.....	<b>32</b>
<b>Figure 12</b>	Schéma général de l'extraction des parties aériennes de la plante <i>Ephedra altissima</i> .....	<b>35</b>
<b>Figure 13</b>	CCM de l'extrait <i>n</i> -butanolique de la plante <i>Ephedra altissima</i> .....	<b>51</b>
<b>Figure 14</b>	CCM récapitulative du fractionnement de l'extrait <i>n</i> -butanolique.....	<b>52</b>
<b>Figure 15</b>	CCM récapitulative de la fraction F <sup>7</sup> -5.....	<b>53</b>
<b>Figure 16</b>	CCM récapitulative de la fraction F <sup>7</sup> -5 révélée sous UV à 254 nm....	<b>54</b>
<b>Figure 17</b>	Profil chromatographique des produits purs (A, B, C et D) sous UV à 365 nm.....	<b>54</b>
<b>Figure 18</b>	Droite d'étalonnage de l'acide gallique.....	<b>57</b>
<b>Figure 19</b>	Droite d'étalonnage de la quercétine.....	<b>57</b>
<b>Figure 20</b>	Droite d'étalonnage de la catéchine.....	<b>57</b>
<b>Figure 21</b>	Activités anti-oxydantes des extraits et des standards vis-à-vis du radical DPPH en fonction de la concentration.....	<b>61</b>

<b>Figure 22</b>	Activités anti-oxydantes des extraits et des standards vis-à-vis du radical DPPH.....	<b>62</b>
<b>Figure 23</b>	Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique pour le test FRAP.....	<b>64</b>
<b>Figure 24</b>	Pouvoir antioxydant des différents extraits (EP, AcOEt et <i>n</i> -BuOH) d' <i>E. altissima</i> selon le test FRAP classé par ordre décroissant.....	<b>64</b>
<b>Figure 25</b>	Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique pour le test CAT.....	<b>66</b>
<b>Figure 26</b>	Pouvoir antioxydant des différents extraits d' <i>E. altissima</i> selon le test CAT classés par ordre décroissant.....	<b>67</b>
<b>Figure 27</b>	Cinétique de blanchissement du $\beta$ -carotène en présence des extraits (EP, AcOEt et <i>n</i> -BuOH) d' <i>E. altissima</i> et des standards.....	<b>69</b>
<b>Figure 28</b>	Activité antiradicalaire des extraits d' <i>E. altissima</i> et des standards.....	<b>71</b>
<b>Figure 29</b>	L'activité antioxydante total des différents extraits d' <i>E. altissima</i> par la méthode de FTC classés par ordre décroissant.....	<b>73</b>
<b>Figure 30</b>	Pouvoir antioxydant des différents extraits d' <i>E. altissima</i> selon le test de piégeage du H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> classés par ordre décroissant.....	<b>75</b>
<b>Figure 31</b>	L'activité anti-arthritique des différents extraits d' <i>E. altissima</i> .....	<b>78</b>
<b>Figure 32</b>	L'activité inhibitrice de la lipase pancréatique des différents extraits d' <i>E. altissima</i> .....	<b>82</b>
<b>Figure 33</b>	L'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase des différents extraits d' <i>E. altissima</i> .....	<b>85</b>
<b>Figure 34</b>	La capacité antioxydante équivalente en Trolox (TEAC) déterminée par le test ABTS $\cdot$ et le pouvoir réducteur du fer des différents extraits d' <i>E. altissima</i> avant et après la DGI <i>in vitro</i> .....	<b>89</b>
<b>Figure 35</b>	Pouvoir inhibiteur des différents extraits d' <i>E. altissima</i> et des standards sur la croissance d' <i>E. coli</i> (CIP 7624).....	<b>93</b>
<b>Figure 36</b>	Pouvoir inhibiteur des différents extraits d' <i>E. altissima</i> et des standards sur la croissance d' <i>E. coli</i> (DSM 1103).....	<b>93</b>
<b>Figure 37</b>	Pouvoir inhibiteur des différents extraits d' <i>E. altissima</i> et des standards sur la croissance d' <i>E. coli</i> (ATTC 25922).....	<b>94</b>
<b>Figure 38</b>	Pouvoir inhibiteur des différents extraits d' <i>E. altissima</i> et des standards sur la croissance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (DSM 1117).	<b>94</b>

<b>Figure 39</b>	Pouvoir inhibiteur des différents extraits d' <i>E. altissima</i> et des standards sur la croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	<b>95</b>
<b>Figure 40</b>	Pouvoir inhibiteur des différents extraits d' <i>E. altissima</i> et des standards sur la croissance de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	<b>95</b>
<b>Figure 41</b>	Pouvoir inhibiteur des différents extraits d' <i>E. altissima</i> et des standards sur la croissance de <i>Streptococcus mutans</i> .....	<b>96</b>
<b>Figure 42</b>	Activité antibactérienne des extraits et des standards exprimés en diamètres de zones d'inhibition (mm).....	<b>99</b>
<b>Figure 43</b>	Profil chromatographique (DAD) de l'extrait acétate d'éthyle obtenu par LC-DAD-ESI/MS.....	<b>104</b>
<b>Figure 44</b>	Profil chromatographique (DAD) de l'extrait n-BuOH obtenu par LC-DAD-ESI/MS.....	<b>104</b>
<b>Figure 45</b>	Spectre UV-Vis du composé A.....	<b>107</b>
<b>Figure 46</b>	Spectre de masse ESI-MS en mode positif du composé A.....	<b>108</b>
<b>Figure 47</b>	Spectre RMN <sup>1</sup> H du composé A.....	<b>108</b>
<b>Figure 48</b>	Etalement de la région aromatique du composé A.....	<b>109</b>
<b>Figure 49</b>	Partie du spectre COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H du composé A.....	<b>110</b>
<b>Figure 50</b>	Spectre RMN <sup>13</sup> C J-modulé du composé A.....	<b>110</b>
<b>Figure 51</b>	Spectre HSQC de la partie aglycone du composé A.....	<b>111</b>
<b>Figure 52</b>	Spectre HMBC de la partie aglycone du composé A.....	<b>112</b>
<b>Figure 53</b>	Corrélations HMBC de la partie aglycone du composé A.....	<b>112</b>
<b>Figure 54</b>	Squelette isorhamnétine du composé A.....	<b>113</b>
<b>Figure 55</b>	Spectre HSQC des protons anomères du composé A.....	<b>113</b>
<b>Figure 56</b>	Spectre COSY H-H de la partie osidique (galactose) du composé A...	<b>114</b>
<b>Figure 57</b>	Spectre TOCSY de la partie osidique (galactose) du composé A.....	<b>115</b>
<b>Figure 58</b>	Structure du premier sucre identifié β-D-galactose.....	<b>115</b>
<b>Figure 59</b>	Spectre COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H de la partie osidique (rhamnose) du composé A	<b>116</b>
<b>Figure 60</b>	Spectre TOCSY de la partie osidique (rhamnose) du composé A.....	<b>117</b>

<b>Figure 61</b>	Spectre HSQC de la partie osidique du composé A.....	<b>117</b>
<b>Figure 62</b>	Spectre HMBC de la partie osidique du composé A.....	<b>118</b>
<b>Figure 63</b>	Spectre de masse ESI du composé B.....	<b>120</b>
<b>Figure 64</b>	Spectre RMN <sup>1</sup> H du composé B.....	<b>121</b>
<b>Figure 65</b>	Spectre COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H de la génine du composé B.....	<b>121</b>
<b>Figure 66</b>	Spectre RMN <sup>13</sup> C <i>J</i> -modulé du composé B.....	<b>122</b>
<b>Figure 67</b>	Spectre HSQC de la partie aglycone du composé B.....	<b>122</b>
<b>Figure 68</b>	Spectre HMBC de la partie aglycone du composé B.....	<b>123</b>
<b>Figure 69</b>	Spectre COSY H-H de la partie osidique (Glucose) du composé B.....	<b>124</b>
<b>Figure 70</b>	Structure du β-D-glucose.....	<b>125</b>
<b>Figure 71</b>	Spectre COSY H-H de la partie osidique (Rhamnose) du composé B..	<b>125</b>
<b>Figure 72</b>	Spectre HSQC de la partie osidique du composé B.....	<b>126</b>
<b>Figure 73</b>	Spectre HMBC de la partie osidique du composé B.....	<b>127</b>

## Liste des Tableaux

Tableau N°	Titre	Page
<b>Tableau 1</b>	Alcaloïdes détectés dans le genre <i>Ephedra</i> L.....	<b>8</b>
<b>Tableau 2</b>	Flavonoïdes isolés du genre <i>Ephedra</i> .....	<b>10</b>
<b>Tableau 3</b>	Autres composés isolés des espèces du genre <i>Ephedra</i> .....	<b>12</b>
<b>Tableau 4</b>	Différents types de flavonoïdes.....	<b>27</b>
<b>Tableau 5</b>	Fractionnement de l'extrait <i>n</i> -butanolique.....	<b>52</b>
<b>Tableau 6</b>	Séparation de la fraction F <sup>3</sup> -5.....	<b>53</b>
<b>Tableau 7</b>	Aspect, couleur et rendement des trois extraits d' <i>Ephedra altissima</i> ..	<b>55</b>
<b>Tableau 8</b>	Mise en évidence de la présence ou l'absence de certaines classes de métabolites secondaires dans l'espèce <i>E. altissima</i> .....	<b>55</b>
<b>Tableau 9</b>	Résultats des taux de polyphénols, flavonoïdes et tanins condensés des extraits obtenus de la plante <i>E. altissima</i> .....	<b>56</b>
<b>Tableau 10</b>	Activité anti-radicalaire des extraits (EP, AcOEt et <i>n</i> -BuOH) de la plante <i>Ephedra altissima</i> .....	<b>60</b>
<b>Tableau 11</b>	Activité antioxydant des extraits (EP, AcOEt et <i>n</i> -BuOH) d' <i>E. altissima</i> et des standards par la méthode de piégeage de permanganate de potassium.....	<b>68</b>
<b>Tableau 12</b>	Activité antiradicalaire des extraits (EP, AcOEt et <i>n</i> -BuOH) d' <i>E. altissima</i> et des standards par la méthode de blanchissement du $\beta$ -carotène.....	<b>70</b>
<b>Tableau 13</b>	L'activité antioxydante total de différents extraits (EP, AcOEt et <i>n</i> -BuOH) d' <i>E. altissima</i> et des standards par la méthode de FTC.....	<b>72</b>
<b>Tableau 14</b>	Pouvoir antioxydant des différents extraits d' <i>E. altissima</i> selon le test de piégeage du H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	<b>74</b>
<b>Tableau 15</b>	L'activité anti-arthritique des différents extraits de l' <i>E. altissima</i> .....	<b>77</b>
<b>Tableau 16</b>	L'activité inhibitrice de la lipase pancréatique des différents extraits de l' <i>E. altissima</i> .....	<b>80</b>

<b>Tableau 17</b>	l'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase des différents extraits de l' <i>E. altissima</i> .....	<b>83</b>
<b>Tableau 18</b>	La capacité antioxydante équivalente de Trolox (TEAC) déterminée par le test ABTS $\cdot$ et le pouvoir réducteur du fer des différents extraits de la plante <i>E. altissima</i> avant et après la DGI <i>in vitro</i> .....	<b>87</b>
<b>Tableau 19</b>	Diamètre des zones d'inhibition de la croissance microbienne par les extraits de la plante <i>Ephédra altissima</i> (en mm).....	<b>91</b>
<b>Tableau 20</b>	Antibiogramme des germes étudiés en présence des différents Antibiotiques (diamètre de la zone d'inhibition en mm).....	<b>92</b>
<b>Tableau 21</b>	les composés phénoliques identifiés dans la plante <i>E. altissima</i> .....	<b>105</b>
<b>Tableau 22</b>	Teneur en composés phénoliques dans les extraits obtenue de la plante <i>E. altissima</i> .....	<b>106</b>
<b>Tableau 23</b>	Déplacements chimiques RMN <sup>1</sup> H (500 MHz) et <sup>13</sup> C (125 MHz) du composé A dans le méthanol deutéré	<b>119</b>
<b>Tableau 24</b>	Les déplacements chimiques RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz) et - <sup>13</sup> C (125 MHz) de la génine (aglycone) et des sucres du composé B.....	<b>128</b>



# Introduction

---

Les radicaux libres ou les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont des molécules hautement instables produites par les organismes vivants au cours du métabolisme cellulaire normal (**Gupta et al., 2014**). Cependant, la production excessive des radicaux libres peut devenir toxique pour les composants majeurs de la cellule et donne lieu au stress oxydatif qui est impliqué dans l'apparition de plusieurs maladies allant de l'artériosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, le diabète, les ischémies et le processus du vieillissement (**Valko et al., 2007**). Cependant, l'utilisation de substances chimiques de synthèse (anti-inflammatoires ou antioxydantes) est accompagnée toujours d'effets secondaires indésirables, alors que l'utilisation de composés phytochimiques s'avère utile et sans effets secondaires nocifs.

L'obésité et le diabète de type 2 sont devenus les problèmes de santé publique les plus courants dans le monde (**Costacou et Mayer-Davis, 2003**). Dans le diabète de type 2 lié à l'obésité, la perte de poids est difficile à atteindre car la plupart des médicaments anti-diabétiques stimule l'augmentation de poids (**Chiasson et al., 2002**). L'inhibition de l'absorption des graisses alimentaires et du sucre dans l'intestin semble être un moyen efficace pour prévenir l'obésité et le diabète de type 2. L'une des approches thérapeutiques permettant de traiter l'obésité et de réduire l'hyperglycémie postprandiale consiste à réprimer la digestion et, par conséquent, l'absorption des graisses alimentaires et du glucose dans le tractus gastro-intestinal par l'inhibition de la lipase pancréatique, la principale enzyme responsable de la digestion des triglycérides et les enzymes hydrolysant les glucides, l' $\alpha$ -amylase et l' $\alpha$ -glucosidase dans le tube digestif (**Morikawa et al., 2010 ; Deshpande et al., 2009**).

Actuellement, uniquement deux médicaments (la lorcasérine et l'orlistat) approuvés cliniquement par la FDA sont préconisés pour traiter l'obésité. Ces molécules agissent en inhibant l'activité de la lipase pancréatique mais elles présentent des risques de maladies du foie et de carences en vitamines, en plus l'inhibition excessive de l' $\alpha$ -amylase pancréatique par les médicaments synthétiques entraîne une fermentation bactérienne anormale des glucides non digérés dans le côlon qui cause des effets secondaires indésirables (**Birari et Bhutani, 2007**). Ce qui rend nécessaire la recherche de nouvelles substances potentiellement plus sûres à partir des plantes et qui peuvent être une alternative préférée pour moduler la digestion des graisses et des glucides afin de traiter le diabète de type 2 lié à l'obésité.

Les maladies infectieuses causées par les bactéries et les champignons affectent sérieusement des millions de personnes dans le monde. A ce sujet, des traitements à base

d'antibiotiques ont été prescrits pour combattre ce fléau. Cependant, l'utilisation abusive et inadéquate des antibiotiques a régulièrement mené à l'apparition de la résistance des souches aux médicaments les plus communément utilisés. En plus, les antibiotiques sont parfois associés à des effets indésirables sur l'hôte telle que l'hypersensibilité allergique. Par conséquent, il y apparaît un besoin de développer des médicaments antimicrobiens alternatifs issus des plantes médicinales pour le traitement des maladies infectieuses (**Arshad et al., 2010**).

Aujourd'hui, les plantes médicinales constituent un patrimoine précieux pour l'humanité et plus particulièrement pour la majorité des communautés des pays en voie de développement qui en dépendent pour assurer leurs soins de santé primaires et leurs subsistances. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), plus de 80% des populations africaines ont recours à la pharmacopée traditionnelle pour faire face aux problèmes de santé, dont le pouvoir thérapeutique des plantes était connu de façon empirique (**Salhi et al., 2010**).

Selon une estimation, plus de 300 000 espèces sont décrites à travers le monde, et 15% d'entre elles ont été étudiées sur le plan phytochimique dont 6% pour leurs activités biologiques (**Negri et Tabach, 2013**), ce qui fait des plantes un réservoir de molécules bioactives encore peu exploré chimiquement et biologiquement.

L'Algérie, présente une grande diversité climatique et taxonomique, ce qui lui donne une grande diversité végétale dont la flore algérienne est estimée à plus de 3152 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques. Parmi ces espèces 15% sont des espèces endémiques (**Quezel et Santa, 1963**). Dernièrement, les médicaments à base de plantes (phytomédicaments) commencent à occuper une place importante dans le marché pharmaceutique en Algérie (**Bouzabata, 2017**).

En effet, la recherche de molécules bioactives à partir des plantes peut s'effectuer selon plusieurs stratégies : une approche ethnopharmacologique qui consiste à utiliser le savoir de la médecine traditionnelle, une approche chimiotaxonomique qui s'intéresse à des taxons connus pour receler des métabolites secondaires particuliers, ou toute combinaison des précédentes.

C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à l'évaluation des activités biologiques et à la caractérisation phytochimique de l'espèce végétale *Ephedra altissima* Desf. de la famille Ephedraceae, qui pousse dans les régions sèches de l'Algérie. Cette plante est connue pour son utilisation en médecine traditionnelle en tant que remède naturel contre l'hypertension vasculaire et pour le traitement des maladies respiratoires et le diabète.

Ce travail s'inscrit globalement dans une perspective de découverte de nouvelles molécules bioactives d'origine végétale et de bioactivités. Il a également pour but de vérifier et justifier l'usage traditionnel de l'espèce *Ephedra altissima* d'une façon rationnelle fondée sur des données scientifiques.

Le travail est divisé en trois parties :

- ✓ Le premier chapitre est consacré à une synthèse bibliographique relative à la famille Ephedraceae, le genre *Ephedra* L. et l'espèce *Ephedra altissima* Desf., des généralités sur les différents phénomènes traités ainsi qu'un rappel sur les flavonoïdes en tant que métabolites secondaires d'intérêts et leurs propriétés biologiques.
- ✓ Le deuxième chapitre est réservé à la partie matériel et méthodes comprenant les volets suivants :
  1. La récolte et l'identification de l'espèce végétale étudiée, l'extraction, le screening phytochimique ainsi que les dosages quantitatifs des taux de polyphénols, flavonoïdes et tannins condensés.
  2. L'évaluation des activités biologiques *in vitro* consistant en l'évaluation de l'activité anti-oxydante des extraits organiques issus de la plante étudiée par huit méthodes différentes ainsi que l'évaluation de l'activité anti-arthritique, l'activité inhibitrice de la lipase pancréatique, l'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase et le protocole de la digestion gastro-intestinale *in vitro*.
  3. L'étude phytochimique de l'extrait *n*-BuOH par l'isolement et la caractérisation des biomolécules en utilisant différentes méthodes chromatographiques et spectroscopiques.
- ✓ Le troisième chapitre est consacré aux résultats obtenus et leur discussion.

# Partie bibliographique

---

## **I.1. Généralités sur la famille Ephedraceae**

Les Ephedraceae sont des plantes phylogénétiquement très anciennes appartenant au groupe des gymnospermes « graines nues », qui ne renferment qu'un seul genre *Ephedra*. Ce sont des petits arbres à branches minces, anguleuses et striées dont les feuilles sont réduites à des écailles membraneuses. Les plantes de cette famille sont réparties principalement dans les régions désertiques d'Asie, d'Amérique et d'Afrique du Nord (Lee, 2011).

### **I.1.1. Présentation du genre *Ephedra* L.**

#### **I.1.1.1. Etymologie**

Le nom *Ephedra* vient du mot grec *Ἐφεδρος* (*éphédros*) qui désignait une plante ressemblant aux prèles (Bonnier, 1934).

#### **I.1.1.2. Description botanique du genre *Ephedra* L.**

Le genre *Ephedra* compte environ 67 espèces distribuées dans tous les biomes terrestres. Les plantes de ce genre sont des arbustes dioïques vivaces à rameaux articulés, dont la hauteur peut atteindre 1 à 3 mètres avec des tiges minces et dressées, à couleurs vertes jaunâtres intersectées et légèrement nervurées.

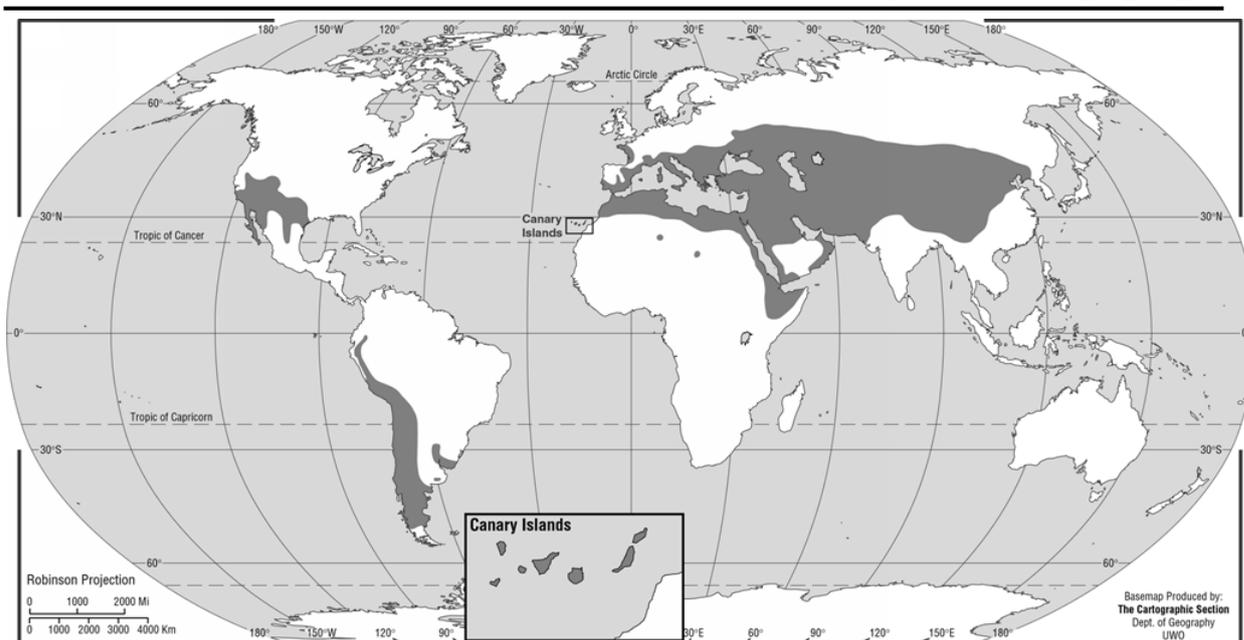
Les canalicules de 1,5 mm de diamètre se terminent par une pointe souvent acérée au niveau des nœuds qui sont écartés de 4 à 6 cm.

Les feuilles réduites en écailles apparaissent triangulaires. Elles se développent en paires opposées ou en verticilles de trois, donnant à la plante l'aspect d'un arbuste sans feuilles.

Les fleurs se trouvent en petits cônes, les mâles et les femelles sont généralement sur des pieds différents et les cônes femelles à bractées s'accroissent pendant la maturation (Ozenda, 1991).

#### **I.1.1.3. Répartition géographique**

Les espèces du genre *Ephedra* poussent principalement dans les régions les plus sèches de l'Asie centrale et de l'ouest, en Europe méditerranéenne, en Amérique, au Moyen-Orient, en Afrique du Nord, y compris les îles canaries (Freitag et Maier-Stolte, 1989) (Figure 1).



**Figure 1:** Répartition géographique des espèces *Ephedra* dans le monde (Starratt et Caveney, 1995)

#### I.1.1.4. Utilisation en médecine traditionnelle

Plusieurs espèces du genre *Ephedra* sont utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement de diverses maladies :

Les tiges des espèces *Ephedra sinica* et *E. equisitina* sont employées comme tisane pour traiter l'asthme, l'hypertension, la congestion du nez et des poumons et le rhume des foins.

La plante *Ephedra alata* qui pousse en Palestine est utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement des maladies allergiques, l'asthme bronchique, les frissons, le rhume, la toux, l'œdème, la fièvre, la grippe et les maux de tête (O'Dowd *et al.*, 1998).

L'espèce *Ephedra alata* est reconnue dans la population égyptienne pour ses effets dépuratifs, hypotenseurs, antiasthmatiques et astringents (Nawwar *et al.*, 1984). En Arabie saoudite, cette plante est préconisée pour le pâturage des animaux à cause de son arôme acceptable (Al-Qarawi *et al.*, 2012).

Au Maroc, *Ephedra alata* est utilisée contre le diabète (Ghourri *et al.*, 2013), mais en Algérie, elle est appliquée sous forme de tisane et par inhalation contre la grippe, la coqueluche, la faiblesse générale (Ould El Hadj *et al.*, 2003) et pour le traitement du cancer (Miara *et al.*, 2019 ; Bouafia *et al.*, 2021).

## I.2. Espèce *Ephedra altissima* Desf.

### I.2.1. Classification systématique

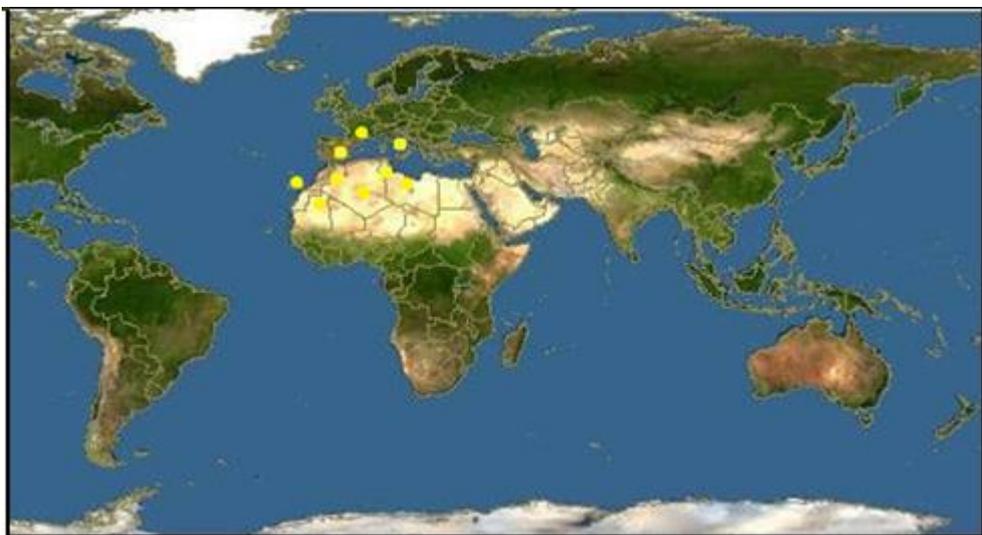
Les botanistes ont classé l'espèce *Ephedra altissima* Desf. comme suit (**Ozenda, 1991**) :

<b>Règne</b>	: Plantae
<b>Embranchement</b>	: Tracheophyta
<b>Sous embranchement</b>	: Gymnospermes
<b>Division</b>	: Gnetophyta
<b>Classe</b>	: Gnetopsida
<b>Ordre</b>	: Ephedrales
<b>Famille</b>	: Ephedraceae
<b>Genre</b>	: <i>Ephedra</i> L.
<b>Espèce</b>	: <i>Ephedra altissima</i> Desf.

### I.2.2. Répartition géographique

L'espèce *Ephedra altissima* est très répandue dans la Sicile, l'Espagne, les rivages des Iles Canaries à 4,000 mètres d'altitude. Aussi cette plante se trouve dans la région méditerranéenne. Elle est distribuée principalement en Libye, Algérie, Tunisie, Maroc, Tchad et Mauritanie (**Dobignard et Chatelain, 2011**)

En Algérie, *Ephedra altissima* pousse dans l'Atlas Saharien et au Sahara central (Hoggar et massifs voisins, Tefdeest et Titaouin), dans les montagnes sèches de l'intérieur et sur le littoral gorges de Tighanimine et Chenoua (**Figure 2**).



**Figure 2:** Distribution géographique de l'espèce *Ephedra altissima* Desf. (**Maire, 1952**)

### I.2.3. Noms communs

L'espèce *Ephedra altissima* Desf. est représentée par plusieurs noms vernaculaires (Quezel et santa, 1963 ; Nowick, 2014) :

**Anglais** : High-climbing joint fir

**Arabe** : Balbal, Abassi, Alenda, Adam, Alda

**Français** : Ephedra élevé

**Amazigh** : Timaiart, Arzoum, Alelga

### I.2.4. Usage traditionnel

L'espèce *Ephedra altissima* est utilisée comme remède contre l'hypertension vasculaire, le traitement des maladies respiratoires, l'asthme, les bronchites et le diabète (Hammiche et Maiza, 2006; Barkaoui et al., 2017 ; Mrabti et al., 2019).

### I.2.5. Description botanique

*Ephedra altissima* est un arbuste dioïque, caractérisée par des tiges grêlées articulées très ramifiées et enchevêtrées dans tous les sens, généralement cette plante ne forme que des broussailles (Maire, 1952) (Figure 3).



**Figure 3:** *Ephedra altissima* Desf. (Maire, 1952)

- Les rameaux sont touffus toujours verts.
- Les jeunes rameaux portent au niveau des nœuds des feuilles opposées, alternes qui peuvent atteindre 1,5 cm.



- Leurs fleurs sont petites, jaunes et très nombreuses
- Floraison: hiver-printemps.



- Les fruits (baies) prennent une couleur rouge en mûrissant.
- Fructification: fin du printemps et début de l'été



### I.3. Etudes phytochimiques antérieures sur le genre *Ephedra* L

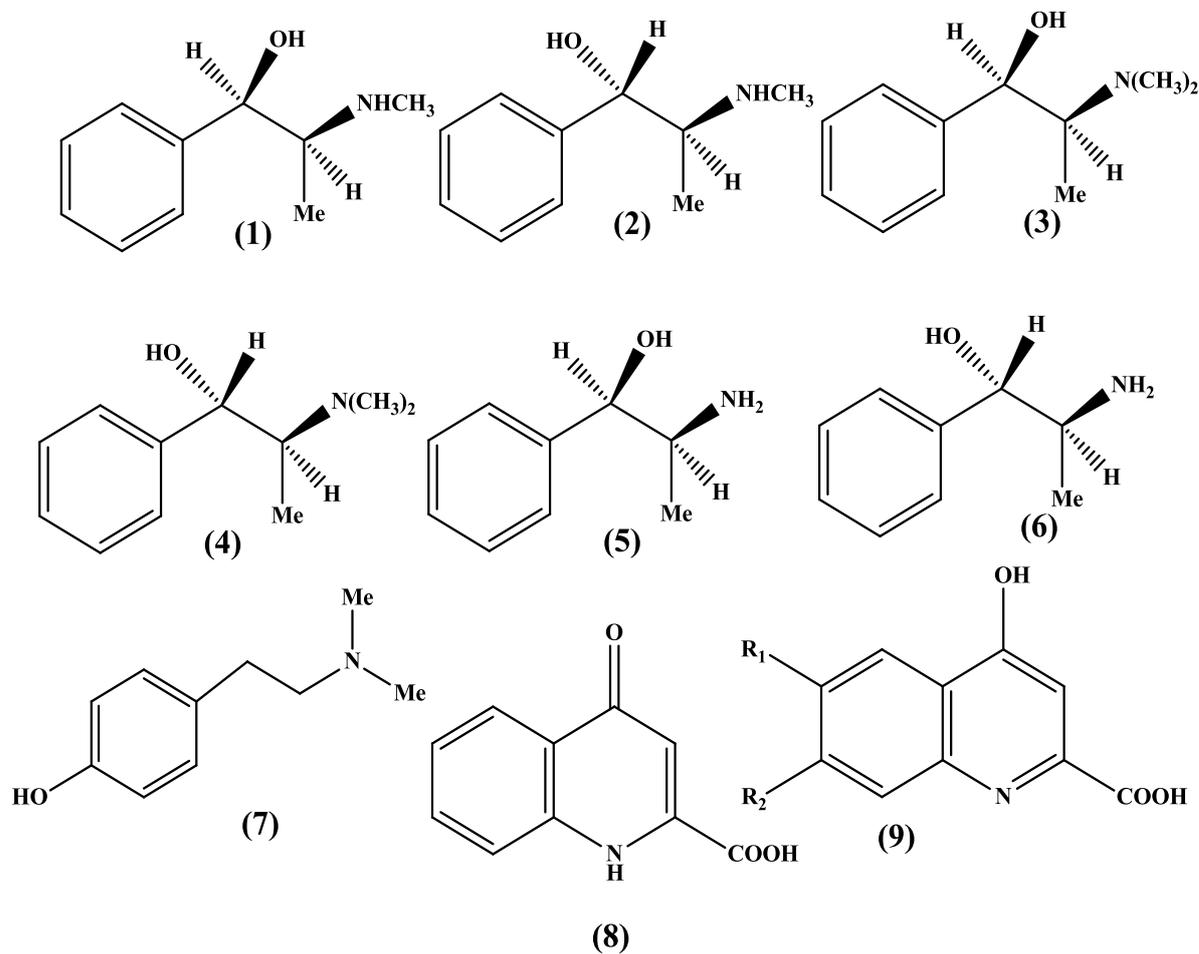
#### I.3.1. Composés isolés des espèces du genre *Ephedra* L

Les travaux de chimie antérieurs réalisés sur les espèces du genre *Ephedra* ont révélé leur richesse en métabolites secondaires notamment les alcaloïdes, les flavonoïdes, les terpenoïdes et les quinones. Dans les tableaux ci- dessous (**Tableaux 1, 2 et 3**), on citera quelques composés isolés de ce genre.

**Tableau 1:** Alcaloïdes détectés dans le genre *Ephedra* L. (Zhang *et al.*, 2018 ; Abourashed *et al.*, 2003)

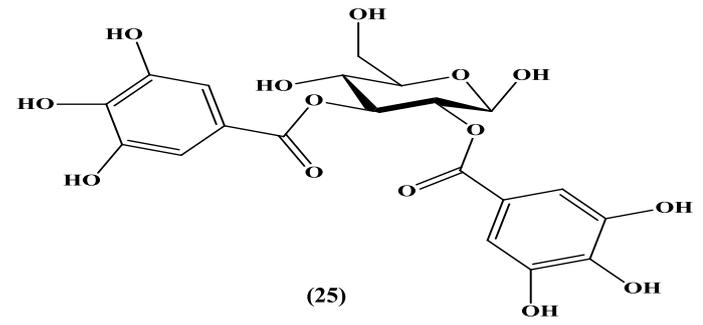
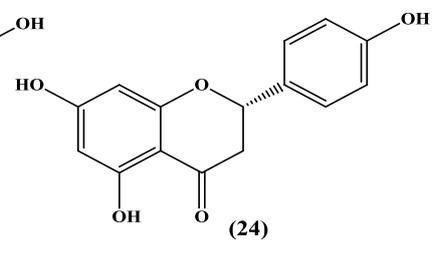
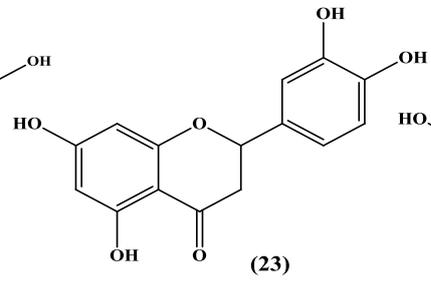
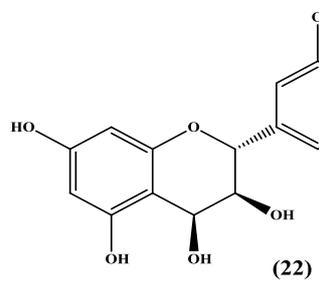
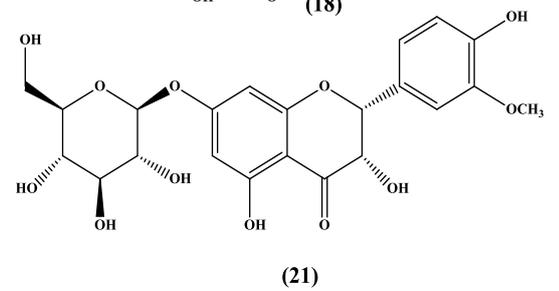
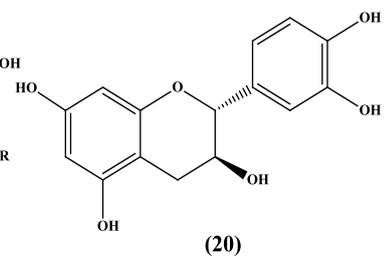
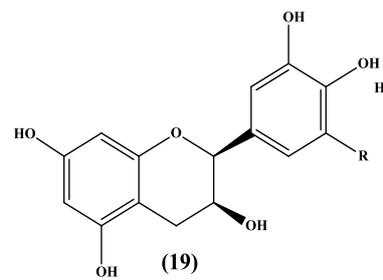
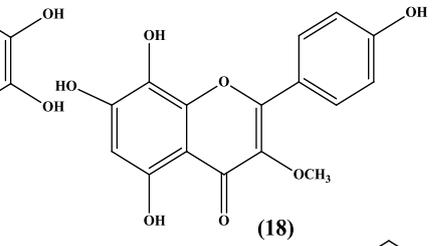
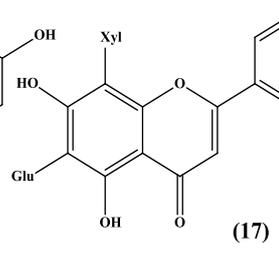
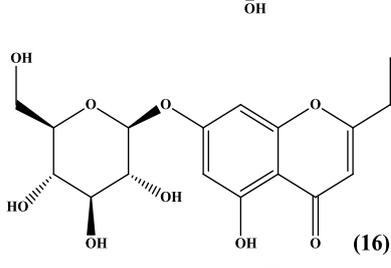
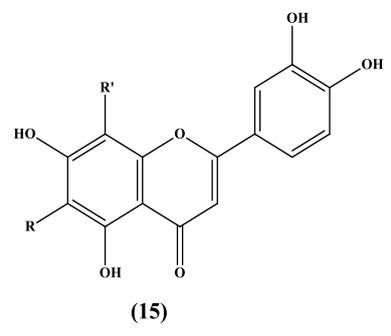
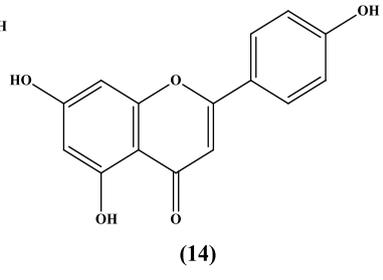
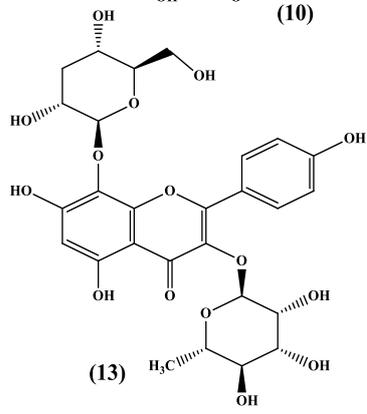
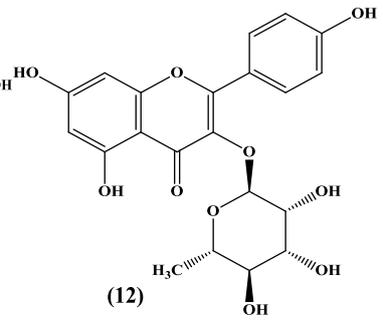
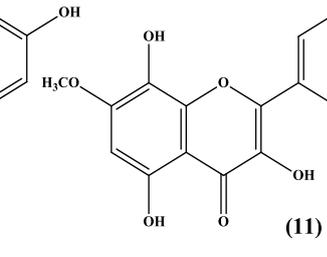
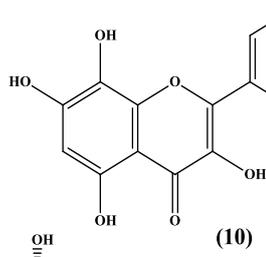
Classe	Noms	Espèces
Alcaloïdes de type amphétamines	D(-) éphédrine (1)	<i>E. sinica</i>
		<i>E. nebrodensis</i>
		<i>E. major</i>
	L(+) pseudoéphédrine (2)	<i>E. sinica</i>
<i>E. nebrodensis</i>		

	D(-) méthyléphédrine (3)	<i>E. sinica</i> <i>E. nebrodensis</i>
	L(+) méthylpseudoéphédrine (4)	<i>E. sinica</i> <i>E. nebrodensis</i>
	D(-) noréphédrine (5)	<i>E. sinica</i> , <i>E. nebrodensis</i>
	L(+) norepseudoéphédrine (6)	<i>E. sinica</i>
	Hordénine (7)	<i>E. aphylla</i>
	Transtorine (8)	<i>E. transitoria</i>
	Acide-6-méthoxykynurénique (9a)	<i>E. foeminea</i>
Alcaloïdes de type quinoléine	R <sub>1</sub> = OCH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> = H	<i>E. foliata</i>
	Acide kynurénique (9b)	<i>E. pachyclada</i>
	R <sub>1</sub> = H, R <sub>2</sub> = H	
	Acide-6-hydroxykynurénique (9c)	<i>E. foeminea</i>
	R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = H	<i>E. Foliata</i>



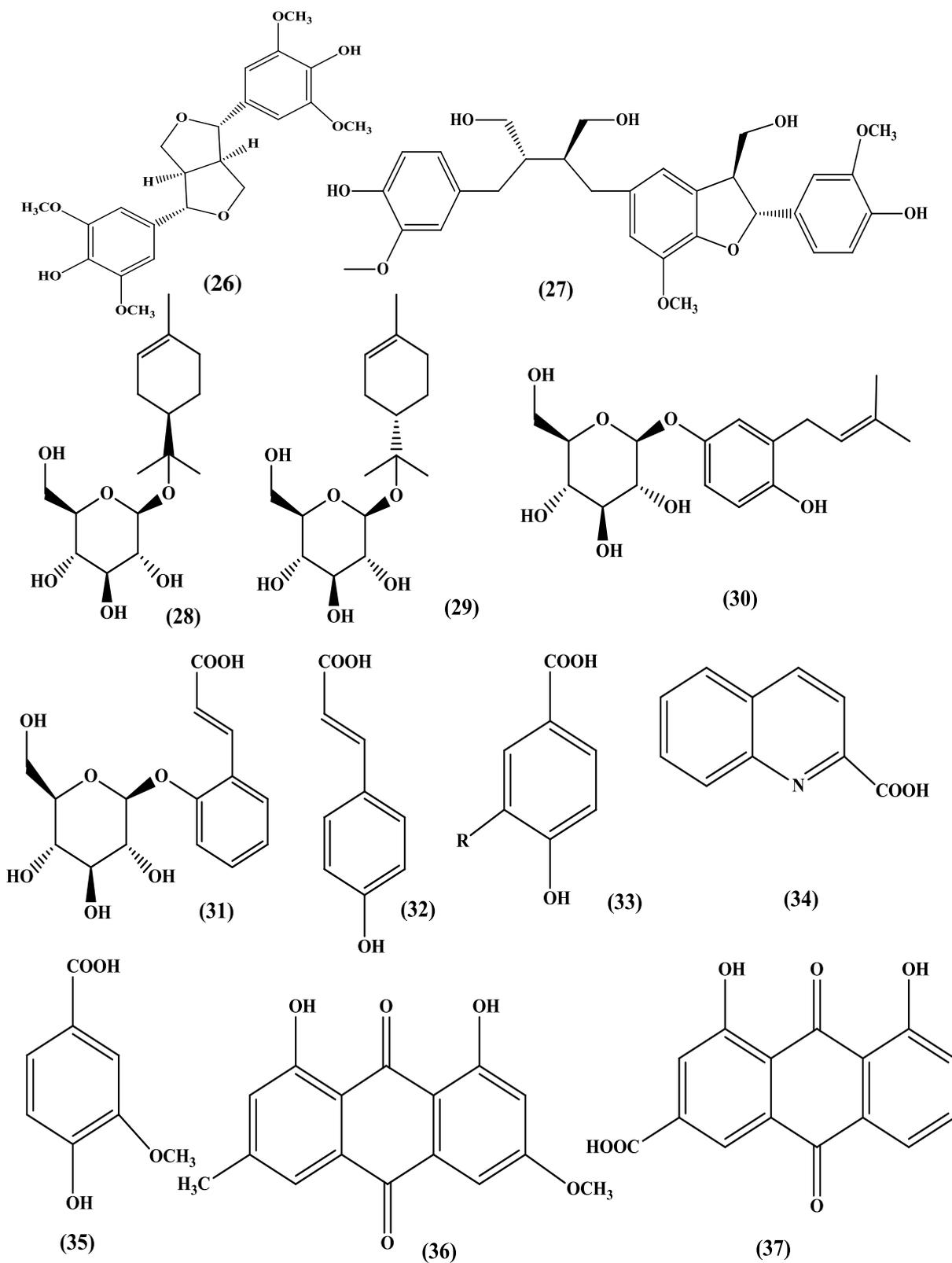
**Tableau 2:** Flavonoïdes isolés du genre *Ephedra* (Zhang *et al.*, 2018 ; Abourashed *et al.*, 2003).

Classe	Noms	Espèces
<b>Flavonols</b>	Herbacétine (10)	<i>E. sinica</i>
	Herbacétine-7-méthyléther (11)	
	Kaempférol-3- <i>O</i> -rhamnoside (12)	<i>E. alata</i>
	Herbacétine-3- <i>O</i> -rhamnoside- 8- <i>O</i> -glucoside (13)	<i>E. aphylla</i>
<b>Flavones</b>	Apigénine (14)	<i>E. antisiphylitica</i>
	Lucénine I R= Xyl, R'= Glu (15)	
	Apigénine-7- <i>O</i> -glucoside (16)	<i>E. campylopoda</i>
	Lucénine III (17)	<i>E. alata</i>
	3-méthoxyherbacétine (18)	<i>E. sinica</i>
<b>Flavanols</b>	Catéchine R=H (19)	<i>E. helvetica</i>
	Gallocatéchine R=OH (19)	
	(-)-épicatechine (20)	<i>E. sinica</i> <i>E. nebrodensis</i>
	Symplocoside (21)	<i>E. sinica</i>
	Leucocyanidine (22)	
<b>Flavonones</b>	3,4',5,7-tétrahydroxy flavanone (23)	<i>E. sinica</i>
	Naringénine (24)	
<b>Tanins</b>	Nilocitine (25)	<i>E. alata</i>



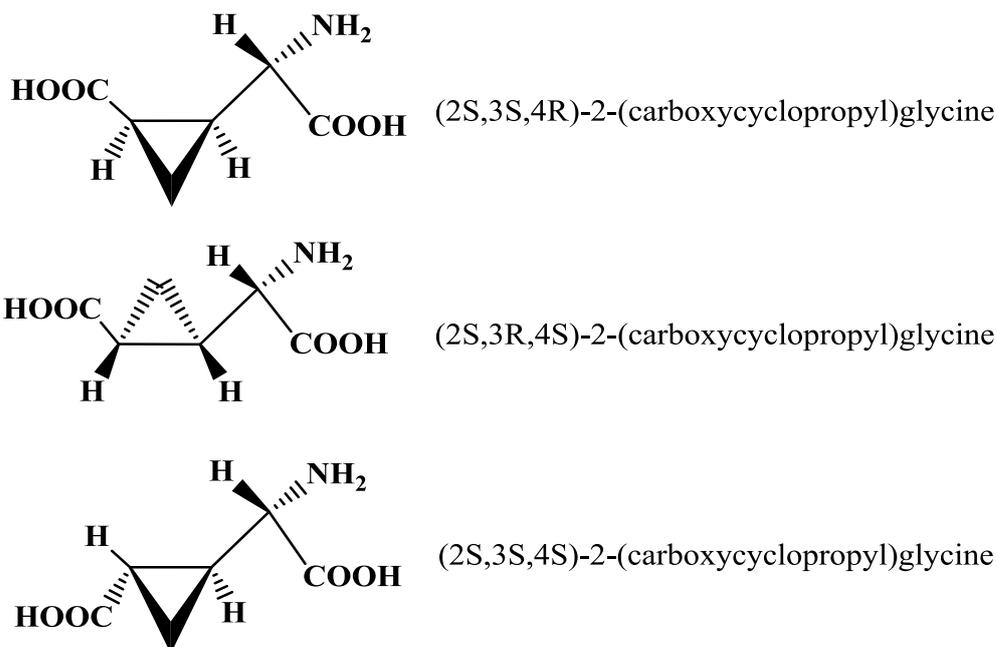
**Tableau 3:** Autres composés isolés des espèces du genre *Ephedra* (Zhang *et al.*, 2018).

Classe	Noms	Espèces
<b>Lignanes</b>	(±)-Syringaresinol (26)	<i>E. alata</i>
	Sesquipinsapol B (27)	<i>E. sinica</i>
<b>Terpénoïdes</b>	(-)- $\alpha$ -terpineol-8- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopyranoside (28)	<i>E. sinica</i>
	(+)- $\alpha$ -terpineol-8- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopyranoside (29)	
<b>Acides phénoliques</b>	Nebrodenside A (30)	<i>E. nebrodensis</i>
	Nebrodenside B (31)	
	$\rho$ -Acide coumarique (32)	<i>E. alata</i>
		<i>E. aphylla</i>
		<i>E. equisetina</i>
Acide $\rho$ -Hydroxybenzoïque (33a) R=H	<i>E. aphylla</i>	
	<i>E. equisetina</i>	
Acide Protocatechuique (33b) R=OH		
Acide quinaldique (34)	<i>E. pachyclada</i>	
Acide vanillique (35)	<i>E. equisetina</i>	
<b>Quinones</b>	Physcione (36)	<i>E. sinica</i>
	Rheine (37)	<i>E. sinica</i>



### I.3.2. Composés isolés de l'espèce *Ephedra altissima* Desf.

L'étude phytochimique réalisée sur l'espèce *Ephedra altissima* Desf. a mis en évidence la présence de trois aminoacides cyclopropanes (Starratt et Caveney, 1995).



## I.4. Notion de stress oxydatif et de système antioxydant

### I.4.1. Radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique contenant un ou plusieurs électrons non appariés. Extrêmement instable, ce composé peut réagir avec les molécules les plus stables pour appairer son électron. L'appellation « espèces réactives d'oxygène (ERO) » inclut les radicaux libres de l'oxygène qui représentent la classe la plus importante d'espèces radicalaires générées dans les systèmes vivants: anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ) mais aussi certains dérivés oxygénés non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). L'anion  $O_2^{\cdot-}$  et le  $H_2O_2$  sont des oxydants moins réactif que  $OH^{\cdot}$ , mais ils ont une durée de vie plus longue leur permettant de se déplacer à partir du site de génération et de réagir avec des molécules dans divers tissus cellulaires (Valko *et al.*, 2007).

A côté des ERO, il existe des ERN (espèces réactives du nitrogène) dont le représentant majeur est l'oxyde nitrique  $NO^{\cdot}$ . C'est un radical peu réactif impliqué dans la neurotransmission et produit lors de métabolisme de l'arginine en citrulline par les oxydes nitriques synthases (NOS) (Ghafourifar et Cadenas, 2005). Le  $NO^{\cdot}$  peut se lier aux radicaux libres oxygénés pour former des molécules plus toxiques comme l'anion peroxydinitrite

(ONOO<sup>-</sup>), un puissant oxydant qui peut provoquer la fragmentation de l'ADN et l'oxydation des lipides (**Carr et al., 2000**).

On peut distinguer les radicaux primaires, qui ont un rôle physiologique particulier et les radicaux secondaires, issus de la réaction des radicaux primaires avec des entités biochimiques cellulaires tels que les lipides, les protéines et les glucides. Les ERO sont produits continuellement à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule eucaryote par divers mécanismes. On parle donc de sources endogènes et de sources exogènes (**Favier, 2003**).

#### **I.4.1.1. Sources exogènes des ERO**

Les radiations X ou gamma peuvent par différents mécanismes faire apparaître des radicaux libres en scindant la molécule d'eau en deux radicaux. Les rayonnements UV sont capables de produire des anions superoxydes ou de l'oxygène singulet après activation des photosensibilisants. Une large variété de xenobiotiques (toxines, pesticides, herbicides, etc...) et médicaments (antibiotiques, anticancéreux, etc...) peuvent contribuer à la production des ERO qui se forment comme un des produits de leur métabolisme (**Shinde et al., 2012**).

#### **I.4.1.2. Sources endogènes des ERO**

Dans les cellules, de nombreux systèmes enzymatiques sont capables de générer des oxydants :

- Les NAD(P) H oxydases sont des enzymes présentes dans la paroi vasculaire et qui génèrent O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en utilisant NADH ou NADPH comme substrat.
- La xanthine-oxydase joue un rôle important dans la production des ERO (particulièrement O<sub>2</sub><sup>•-</sup> et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), lors de l'ischémie/reperfusion (**Alujoju et al., 2015**).

De plus, dans l'organisme, l'oxygène est réduit à 95 % dans les mitochondries par voie enzymatique en molécule non toxique comme H<sub>2</sub>O. Cependant, il peut subir une réduction monoélectronique et former une espèce beaucoup plus réactive comme l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Cet anion n'est pas le radical le plus délétère, cependant il peut donner naissance à des espèces beaucoup plus réactives comme le radical hydroxyle HO<sup>•</sup> (**Li et al., 2013**).

#### **I.4.2. Stress oxydant**

Les espèces oxygénées activées (EOA) à faibles doses agissent comme des messagers secondaires (transmission d'informations à la cellule) en régulant l'activité des facteurs de transcription qui contrôlent l'expression des gènes codant pour diverses protéines. Les EOA peuvent déclencher un mécanisme protecteur très important pour l'organisme qu'est le phénomène de l'apoptose (mort cellulaire programmée de la cellule à un stade pré-cancéreux) (**Pincemail et al., 2014**).

Dans certaines situations, une production élevée des EOA entraîne un stress oxydatif qui est défini comme un déséquilibre entre la production et la destruction de ces molécules. En revanche, le stress oxydatif est susceptible d'entraîner des dégâts cellulaires qui pourraient être à l'origine de certaines pathologies: cancer, diabète, maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer, la polyarthrite rhumatoïde et le vieillissement accéléré. 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 de radicaux (**Hagen *et al.*, 2004**).

### **I.4.2.1. Oxydation de l'ADN**

Le radical hydroxyle est connu pour réagir avec tous les composants de la molécule d'ADN, d'endommager à la fois les bases puriques et pyrimidiques et aussi le squelette désoxyribose. Les modifications permanentes du matériel génétique résultant de ces incidents de "dommages oxydatifs" représentent la première étape impliquée dans la mutagenèse et la cancérogenèse (**Valko *et al.*, 2007**). L'ADN mitochondriale est la cible privilégiée des oxydations par les ERO car il est dépourvu d'histones et ne semble pas avoir de systèmes de réparation aussi efficaces que celui de l'ADN nucléaire, mais aussi du fait de sa proximité directe de l'une des principales sources d'ERO cellulaires : la chaîne respiratoire mitochondriale (**Melov *et al.*, 2000**).

### **I.4.2.2. Oxydation des protéines**

Les radicaux libres peuvent réagir avec les acides aminés contenant des groupes insaturés ou de soufre tels que la phénylalanine et la cystéine. C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport. Ces réactions donnent lieu à des perturbations structurelles dans les protéines, tels que les phénomènes d'agrégation qui sont favorisées par la formation de liaisons disulfures inter et intramoléculaire. L'oxydation des protéines ainsi, inactive les protéines, augmente leur hydrophobicité et leur sensibilité à la protéolyse (**Chevion *et al.*, 2000**).

### **I.4.2.3. Oxydation des lipides**

Les radicaux, hydroxyle et hydroperoxyde, sont capables d'attaquer les acides gras insaturés des phospholipides et d'autres molécules lipidiques de la membrane, initiant de cette façon, la peroxydation lipidique. Dans ce processus, le radical libre primaire arrache un atome d'hydrogène soit d'un acide gras, soit du cholestérol. Le radical produit réagit facilement avec l'oxygène moléculaire pour former un radical peroxyde, qui peut à son tour enlever un atome d'hydrogène d'une autre molécule de lipide permettant la propagation de la chaîne de

peroxydation. La peroxydation lipidique provoque de graves dommages à la structure membranaire et, par conséquent, modifie sa fluidité et sa capacité de fonctionner correctement (Marnett *et al.*, 1999).

#### I.4.2.4. Oxydation des glucides

Les radicaux peuvent oxyder les monosaccharides, mais ils peuvent également réagir avec des polysaccharides et induits leur dépolymérisation. Le radical OH<sup>•</sup> est capable de couper les molécules de sucres (désoxyribose, mannose, glucose) et de susciter ainsi des liaisons entre sucres et protéines provoquant des épaisissements membranaires (Valko *et al.*, 2007).

#### I.4.3. Défense antioxydante

Un antioxydant est une substance qui inhibe ou retarde significativement l'oxydation d'un substrat, alors qu'elle présente une concentration très faible dans le milieu où elle intervient (Halliwell, 1999). Les composés antioxydants peuvent être recyclés dans la cellule ou bien ils sont irréversiblement endommagés, mais leurs produits d'oxydation sont moins nuisibles, ou peuvent être en outre convertis en substances inoffensives (Matkowski, 2008). Ces systèmes antioxydants sont soit des molécules qui captent rapidement les espèces réactives, soit des systèmes enzymatiques qui catalysent la conversion des molécules pro-oxydantes en molécules stables (Schulz *et al.*, 2004). Donc selon le mode d'action de ces systèmes, on distingue deux classes d'antioxydants enzymatiques et non enzymatiques.

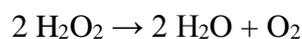
##### I.4.3.1. Système enzymatique

Toutes les cellules dans les organismes eucaryotes contiennent de puissantes enzymes antioxydantes. On en compte trois principales, superoxyde dismutase, catalase et glutathion peroxydase.

- Superoxyde dismutase: Il catalyse la dismutation de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire (Zelko *et al.*, 2002):

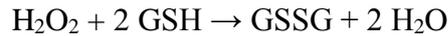


- Catalase: Il catalyse la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire lorsque la concentration intracellulaire de celui-ci est très élevée:



- Glutathion peroxydase: Il joue un rôle très important dans la détoxification de l'organisme du peroxyde d'hydrogène et des hydroperoxydes organiques résultant de l'oxydation du

cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de ces dérivés réactifs avec l'oxydation de substrats réducteurs comme le glutathion (GSH):



Comparativement à la catalase, le glutathion peroxydase présente une forte affinité pour le substrat  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Seifried *et al.*, 2007)

#### **I.4.3.2. Système non enzymatique**

Il existe un certain nombre de petites molécules, largement distribuées dans les systèmes biologiques, qui peuvent piéger les radicaux libres. Ce groupe de molécules renferme de nombreuses substances hydro- ou liposolubles endogènes synthétisées par les cellules, parmi lesquelles on peut citer le glutathion, l'acide urique, la taurine et l'hypotaurine (Pincemail *et al.*, 2002). D'autres composés exogènes apportés par l'alimentation peuvent aussi jouer le rôle des antioxydants, tels que la vitamine E (tocophérol), la vitamine C (acide ascorbique), les caroténoïdes et les flavonoïdes (Valko *et al.*, 2007). De plus, la prévention de l'initiation de réactions en chaîne comprend la fixation d'ions métalliques, des ions de fer et de cuivre en particulier. Ainsi les protéines (ferritine, transferrine et céruloplasmine) sont d'une importance centrale dans le contrôle de l'état rédox de l'organisme (Sies, 1997).

#### **I.4.3.3. Polyphénols comme antioxydants**

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 leur confèrent une activité antioxydante aussi importante. Les groupes hydroxyles des polyphénols sont bien des donneurs d'atomes d'hydrogène ; ils peuvent réagir avec les espèces réactives de l'oxygène et les espèces réactives de l'azote, enfin de réaction, le cycle de génération de nouveaux radicaux est interrompu. Le pouvoir antioxydant des composés phénoliques est également attribué à leur capacité à chélater les métaux ioniques impliqués dans la production de radicaux libres. Cependant, les composés phénoliques peuvent agir comme des pro-oxydants (Tsao, 2010).

### **I.5. Inflammation et anti-inflammatoires**

L'inflammation est une réponse protectrice normale aux dommages de tissu provoqués par des traumatismes physiques, produits chimiques nocifs ou agents microbiens. Cependant, cette réaction se manifeste par des symptômes plus ou moins pénibles décrits comme rougeur, chaleur, douleur et gonflement (Gy *et al.*, 2008). Elle est déclenchée par le dégagement des

médiateurs chimiques issus de l'activation cellulaire. La fonction principale de l'inflammation est de résoudre l'infection et réparer les dommages afin de rétablir l'équilibre d'homéostasie, ainsi, la réponse inflammatoire idéale est rapide et destructive. La réponse inflammatoire se déroule en quatre étapes : la reconnaissance des signaux de danger, le recrutement de cellules sur le site d'infection, l'élimination du pathogène et la résolution de l'inflammation conduisant à un retour à l'homéostasie et à la cicatrisation du tissu lésé. En l'absence d'une résolution, s'installe une inflammation chronique (**Lafuente et al., 2009**).

### **I.5.1. Inflammation aiguë**

Il s'agit de la réponse immédiate à un agent agresseur, de courte durée (quelques jours à quelques semaines), d'installation souvent brutale et caractérisée par des phénomènes vasculo-exsudatifs intenses. Les inflammations aiguës guérissent spontanément ou avec un traitement, mais peuvent laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante (**Charles et al., 2010**). L'inflammation aiguë se constitue en trois phases :

#### **I.5.1.1. Phase vasculaire**

Il s'agit d'une vasoconstriction artériolaire, très brève de quelques secondes. Elle est due à l'action du système sympathique et est très rapidement ressentie puisque douloureuse, expliquée par la libération d'histamine de sérotonine et de kinine. Très vite à cette vasoconstriction, va faire suite une vasodilatation des vaisseaux sanguins. Le débit local est augmenté et la perméabilité des capillaires est exacerbée, ce qui explique l'extravasation des cellules sanguines (diapédèse). Ce qui explique en partie la constitution de la chaleur et de la rougeur. La migration des cellules s'accompagne d'un transfert de plasma qui crée l'œdème. (**Kumar et al., 2007**).

#### **I.5.1.2. Phase cellulaire**

Elle est caractérisée par la formation du granulome inflammatoire. Le foyer inflammatoire s'enrichit rapidement en cellules provenant du sang et du tissu conjonctif local. Les cellules infiltrées sont les mastocytes dégranulés, les monocytes, les macrophages, les polynucléaires neutrophiles et les lymphocytes. Ces cellules s'agrègent en raison de la forte production de facteurs chimioattractants (**Rousselet et al., 2005**).

#### **I.5.1.3. Phase de résolution**

La phase de résolution, dépend du degré des lésions tissulaires. En effet, dans les conditions les plus favorables, les agents agresseurs sont éliminés par les PMNs, et les produits de dégradation ainsi que les débris cellulaires sont phagocytés par les macrophages. Le retour à un état physiologique consiste en la réparation de l'endothélium par les cellules

endothéliales elles-mêmes dans un premier temps. Les macrophages vont participer à l'angiogenèse, mais ce sont surtout les fibrocytes puis les fibroblastes qui vont produire les protéines matricielles des tissus intercellulaires comme le collagène, la fibronectine et la laminine pour permettre la reconstruction des tissus. Le système de l'angiogenèse est ainsi remis au repos et la réaction inflammatoire peut s'éteindre (Weill *et al.*, 2003).

### **I.5.2. Inflammation chronique**

Morphologiquement, l'inflammation chronique est définie par la présence de lymphocytes, macrophages, et plasmocytes dans les tissus. Dans de nombreux cas, la réponse inflammatoire chronique peut persister pendant de longues périodes (plusieurs mois ou années). Elle est considérée comme être causé par l'engagement persistant des réponses de l'immunité innée et acquise (Charles *et al.*, 2010).

L'arthrite est un type de trouble articulaire qui implique une inflammation chronique d'une ou plusieurs articulations, responsable de la douleur gonflement, raideur, perte de fonction dans l'articulation. La dénaturation des protéines est l'une des causes de l'arthrite et peut entraîner la production d'auto-antigène dans certaines maladies arthritiques (Shravan *et al.*, 2011).

### **I.5.3. Anti-inflammatoires**

#### **I.5.3.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens**

Les anti-inflammatoire non stéroïdiens (AINS) sont une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires, anti-pyrétiques et antalgiques. Le mécanisme d'action des AINS repose en grande partie sur l'inhibition compétitive, réversible ou non, de la cyclooxygénase, enzyme qui permet la production de prostaglandine à partir de l'acide arachidonique. L'activité des AINS dans la polyarthrite rhumatoïde et d'autres maladies inflammatoires ne semble pas être uniquement due à l'inhibition de la production de prostaglandines endogènes mais aussi en empêchant la dénaturation des protéines (Nicolas *et al.*, 2001).

#### **I.5.3.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens**

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol, principal glucocorticoïde surrénalien. Les glucocorticoïdes sont des substances dérivées du cholestérol, dont la production est stimulée par l'ACTH libérée selon un cycle nyctéméral par le lobe antérieur de l'hypophyse. Les glucocorticoïdes, anti-inflammatoires stéroïdiens, ont tous une activité hormonale, concernant principalement les régulations métaboliques, et exercent un effet freinateur sur l'axe hypothalamo-hypophysaire

surrénalien. Les glucocorticoïdes sont capables d'empêcher la transcription de tous les gènes immuns, incluant celui codant IL-2 (Nicolas *et al.*, 2001).

### **I.5.3.3. Anti-inflammatoires d'origine végétale**

Le nombre de composés phytochimiques trouvés dans le règne végétal est très vaste, et leur spectre d'activité est tout aussi grand. Certains de ces composés phytochimiques ont des propriétés anti inflammatoires. Beaucoup sont présumés agir en bloquant les voies de la cyclooxygénase et la lipoxygénase ainsi que par d'autres mécanismes (Soeken *et al.*, 2003).

## **I.6. Syndrome métabolique et les enzymes de digestion**

### **I.6.1. Syndrome métabolique**

Le syndrome métabolique est défini par un groupe de différents facteurs de risque métaboliques y compris l'obésité, l'hyperglycémie, la dyslipidémie athérogène et l'hypertension. Les personnes atteintes du syndrome métabolique sont exposées à un risque accru de diabète de type 2 et de maladies cardiovasculaires (Grundy *et al.*, 2004).

#### **I.6.1.1. Obésité**

L'obésité, définie comme une accumulation excessive de graisse corporelle, peut être liée à une augmentation des risques de maladies coronariennes, d'hypertension, de diabète sucré non insulino-dépendant et de certains types de cancer. La principale caractéristique de l'obésité est l'expansion du tissu adipeux avec accumulation de triglycérides (Mokdad *et al.*, 2003). La plupart des triglycérides dans les adipocytes sont synthétisés à partir d'acides gras libres provenant des lipides alimentaires. La digestion des graisses alimentaires est nécessaire pour leur absorption et un tel processus se produit par hydrolyse des lipides résultant de l'activité de la lipase, libérant ainsi des acides gras et du glycérol (Mukherjee, 2003).

La plus importante stratégie dans le traitement de l'obésité comprend le développement d'inhibiteurs de la digestion et l'absorption des nutriments, dans le but de réduire l'apport énergétique à travers les mécanismes gastro-intestinaux sans altérer les mécanismes centraux. L'inhibition des enzymes digestives est l'un des mécanismes les plus étudiés, utilisé pour déterminer l'efficacité potentielle de produits naturels en tant qu'agents anti-obésité (Morikawa *et al.*, 2010). Les triglycérides sont l'une des principales sources d'énergie qui est riche en calories. La suppression de l'absorption des triglycérides est directement associée à la prévention de l'obésité et les maladies liées à l'obésité (Lowe *et al.*, 2002).

### **I.6.1.2. Diabète non insulino-dépendant**

Le diabète non insulino-dépendant (DNID) connu sous le nom diabète de type 2 est un trouble fréquent du métabolisme du glucose et des graisses. Le diabète de type 2 est un trouble métabolique complexe caractérisé par une hyperglycémie résultant d'une résistance accrue à l'insuline. Hyperglycémie, un symptôme typique chez les patients DNID, est une affection caractérisée par une augmentation rapide de la glycémie et est due à l'hydrolyse de l'amidon par l' $\alpha$ -amylase pancréatique et à l'absorption du glucose dans l'intestin grêle par l' $\alpha$ -glucosidase. L'une des approches thérapeutiques permettant de réduire l'hyperglycémie postprandiale consiste à retarder la digestion du glucose par l'inhibition des enzymes hydrolysant les glucides, l' $\alpha$ -amylase et l' $\alpha$ -glucosidase dans le tube digestif (**Deshpande *et al.*, 2009**). L'inhibition de l' $\alpha$ -amylase contribue à améliorer les symptômes du diabète de type 2 en interrompant ou en retardant l'absorption du glucose à la suite d'un ralentissement de la digestion de l'amidon et par conséquent ralentir la production du maltose et du glucose, il peut également ralentir la fonction de l' $\alpha$ -glucosidase en éliminant le substrat de cette enzyme. L'inhibition de l'absorption des graisses alimentaires et du sucre de l'intestin semble être un moyen efficace de prévenir l'obésité et le diabète de type 2 (**Joshi *et al.*, 2015**).

### **I.6.2. Enzymes de digestion**

#### **I.6.2.1. $\alpha$ -amylase pancréatique et l' $\alpha$ -amylase salivaire**

L' $\alpha$ -amylase pancréatique et l' $\alpha$ -amylase salivaire ( $\alpha$ -1,4-glucan-4-glucanohydrolase) catalysent l'hydrolyse des liaisons-1,4-glycosidiques dans l'amidon, le glycogène et d'autres oligo et polysaccharides. L'amylase salivaire, l'enzyme la plus abondante dans la salive humaine, initie la digestion des glucides complexes dans la cavité buccale humaine, où en particulier l'amidon est partiellement digéré en oligosaccharides, maltose et glucose. Le processus est ensuite complété par l' $\alpha$ -amylase pancréatique qui est une endoglycosidase délivrée dans la lumière intestinale en tant que constituant du suc pancréatique et catalyse l'hydrolyse de l'amidon en maltose et maltotriose (**Boehlke *et al.*, 2015**).

Chez l'homme, cinq isoenzymes d' $\alpha$ -amylase ont été décrits. Les trois isoformes d' $\alpha$ -amylase salivaire et les deux isoformes d' $\alpha$ -amylase pancréatique sont classés en deux familles différentes d'isoenzymes. Structurellement, ces enzymes sont toutes très étroitement liées. L'administration de ces molécules peut constituer un traitement de première intention utile chez les patients diabétiques présentant une combinaison de glycémie plasmatique basale légèrement élevée et d'hyperglycémie postprandiale marquée (**Lee *et al.*, 2015**).

### **I.6.2.2. $\alpha$ -glucosidase**

L' $\alpha$ -glucosidase est une enzyme liée à la membrane située dans l'épithélium de l'intestin grêle, et il catalyse le clivage des liaisons glycosidiques et la libération du glucose à partir de disaccharides et d'oligosaccharides (**Li et al., 2005**).

### **I.6.2.3. Lipase pancréatique**

La lipase pancréatique (triacylglycérol acyl-hydrolase) produite par les cellules acineuses pancréatiques hydrolyse des triglycérides principalement en 2-monoacylglycérols et des acides gras libres, et il est responsable de l'hydrolyse de 50 à 70% du total des graisses alimentaires dans la lumière intestinale (**Birari et Bhutani, 2007**).

### **I.6.3. Inhibiteurs de lipase pancréatique et de l' $\alpha$ -amylase**

Les inhibiteurs d' $\alpha$ -amylase aident à la prévention et au traitement médical des syndromes métaboliques tels que le diabète de type 2 et l'obésité, dans lesquels ils contrôlent l'élévation de la glycémie en retardant et en bloquant la digestion et l'absorption des glucides postprandiaux (**Jayaraj et al., 2013**). Il a été rapporté que différents types de molécules possédaient une activité inhibitrice de la  $\alpha$ -amylase. Parmi ces molécules, on trouve les flavonoïdes, les polyphénols, les tanins condensés, les tanins hydrolysables, les terpènes et les dérivés de l'acide cinnamique

Les inhibiteurs de la lipase pancréatique isolés de plantes sont classés dans les classes de composés chimiques suivantes: saponines, terpènes et composés phénoliques. Cependant, il est de plus en plus reconnu que parmi les différentes classes de composés phytochimiques, les composés phénoliques sont les inhibiteurs de lipase les plus actifs (**Miao et al., 2015**).

## **I.7. Activité antibactérienne**

### **I.7.1. Généralités sur la thérapeutique des infections bactériennes**

Les infections microbiennes ont été la principale cause de maladies tout au long de l'histoire de l'humanité (**Dzidic et al., 2008**). La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. L'utilisation des antibiotiques conduit dans la très grande majorité des cas à la sélection de populations microbiennes résistantes. Cette résistance est due à des mutations chromosomiques ou à l'acquisition de gènes de résistance portés par des éléments génétiques mobiles (plasmides, phages, transposons, intégrons). Ces résistances ont conduit à chercher de nouveaux agents antimicrobiens possédant une efficacité plus importante que les drogues synthétiques d'une part et bien acceptés par l'organisme d'autre part. Une des approches courantes pour la recherche des substances biologiquement actives est le criblage systématique des micro-organismes ou des plantes, qui sont des sources

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

### I.7.2. Types de bactéries infectives

La paroi des bactéries est un véritable exosquelette qui confère à la cellule sa forme et lui permet de résister à la forte pression osmotique interne comprise entre 5 et 20 atm. La paroi est formée d'un polymère : le peptidoglycane (mucopéptide ou muréine ou mucocomplexe). La paroi n'est pas une barrière sélective comme la membrane plasmique et sert à la classification des bactéries, elle permet de distinguer entre les bactéries à Gram positif ou à Gram négatif.

Chez les bactéries à Gram positif, la paroi est constituée presque exclusivement de la couche de peptidoglycane, à laquelle sont associés des polymères d'acides teichoïques. Les bactéries à Gram négatif ont une paroi plus complexe. La couche de peptidoglycane est plus fine que celle des Gram positif, et elle est entourée par une membrane externe composée de lipopolysaccharides et de lipoprotéines. La partie lipopolysaccharidique de la paroi des Gram négatif comprend les molécules d'endotoxine (lipide A) qui contribuent au pouvoir pathogène bactérien (Prescott, 2003).

### I.7.3. Principales substances antimicrobiennes

#### I.7.3.1. Antibiotiques

Les antibiotiques, au sens strict, sont des produits élaborés par des micro-organismes, mais on inclut généralement parmi eux les dérivés semi-synthétiques et les produits entièrement synthétiques, capables à faible dose de tuer ou d'inhiber spécifiquement la croissance du germe par un mécanisme particulier sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs. Pour qu'il soit actif, un antibiotique doit pénétrer dans la bactérie sans ne être détruit ni être modifié, se fixer sur une cible et perturber la physiologie bactérienne (Bergogne et Dellamonica, 1995).

#### I.7.3.2. Composés phénoliques

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* se sont focalisées sur l'évaluation des propriétés antimicrobienne des polyphénols. A l'heure actuelle, cet effet est certain et démontré par de nombreuses recherches expérimentales. Les études du pouvoir inhibiteur des flavonoïdes sur la croissance bactérienne ont démontré que de nombreux composés flavoniques (apigénine, kaempférol et d'autres) sont doués d'un effet important sur différentes souches bactériennes à

Gram négatif (*Escherichia coli*) et Gram positif (*Staphylococcus aureus*) (Ulanowska *et al.*, 2007).

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

#### **I.7.4. Mécanisme de l'effet antimicrobien**

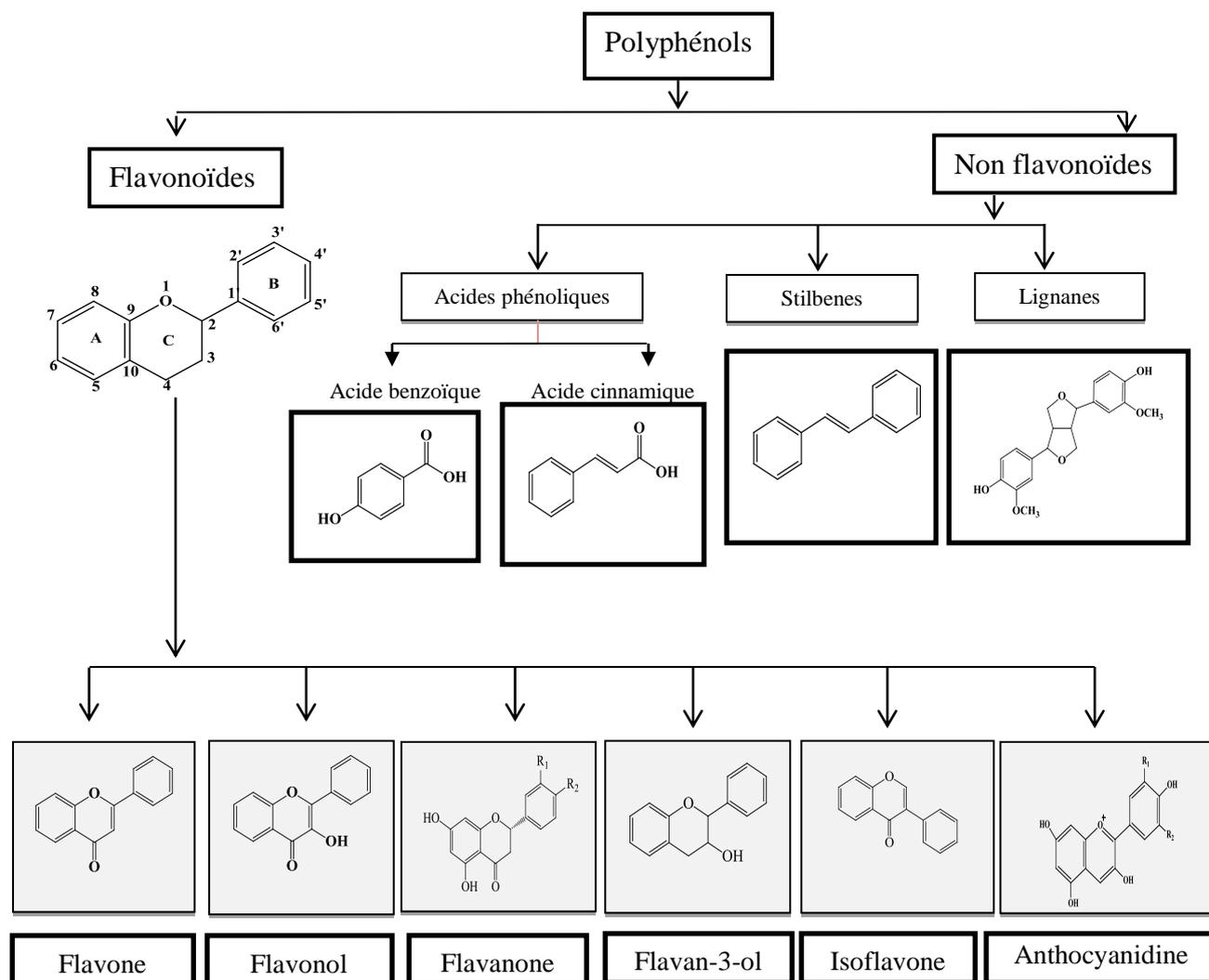
Il est très complexe et peut impliquer de multiples modes d'actions tels que l'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes, la séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne ou la chélation de métaux tels que le fer, l'inhibition du métabolisme microbien, la dégradation de la paroi cellulaire, la perturbation de la membrane cytoplasmique (ce qui cause une fuite des composants cellulaires) et l'influence sur la synthèse de l'ADN, de l'ARN, des protéines et des lipides (Zhang *et al.*, 2009).

### **I.8. Composés polyphénoliques**

#### **I.8.1. Généralités sur les polyphénols**

Les composés phénoliques constituent l'une des classes de produits naturels les plus répandus dans le règne végétal. Ils sont caractérisés par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes. La distribution vaste de ces composés a conduit à différentes façons de classification, qui est basée sur l'origine et la structure chimique (Tsao, 2010).

Les polyphénols sont classés en fonction du nombre d'anneaux phénoliques, le nombre et la position des fonctions chimiques et le degré d'insaturation. Les principaux groupes de cette classe de métabolites secondaires sont les flavonoïdes, les acides phénoliques, les stilbènes et les lignanes (Figure 4) (D'Archivio *et al.*, 2007).



**Figure 4:** Classification des polyphénols (Atta, 2018)

### I.8.2. Flavonoïdes

Le mot flavonoïde est dérivé du mot latin *flavus* qui signifie jaune, et de nombreux flavonoïdes sont effectivement de couleur jaune (Bone et Mills, 2012). Ils se produisent parfois dans les plantes sous la forme aglycone, mais la majorité des flavonoïdes existe sous la forme glycosylée.

Les flavonoïdes représentent une large classe de métabolites secondaires avec environ de 5000 produits, qui sont identifiés à partir des plantes. Ces composés partagent un squelette à 15 atomes de carbone (C6 – C3 – C6) de 3 cycles aromatiques (A, B, C). Le cycle A est un cycle benzénique fusionné avec un cycle à 6 chaînons (cycle C) portant le cycle B, c'est-à-dire un phényle benzène en position 2 comme un substituant (Patil et Masand, 2018) (Figure 5).

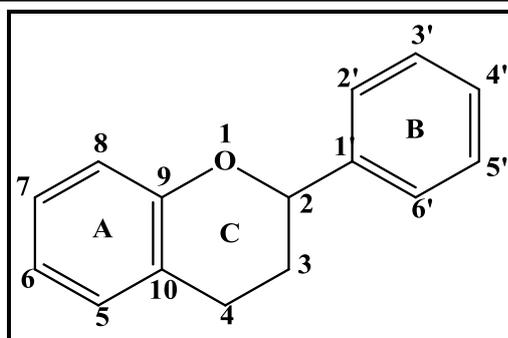


Figure 5: Structure de base des flavonoïdes (C6-C3-C6)

### I.8.2.1. Classification et structures chimiques

Tous les flavonoïdes dérivent de l'enchaînement benzo- $\gamma$ -pyrone et peuvent être classés selon la nature des différents substituants présentés sur les cycles de la molécule et du degré d'insaturation du squelette benzo- $\gamma$ -pyrone.

Dans la majorité des flavonoïdes le cycle B est attaché au carbone en position C-2 du cycle C, d'autres composés présentent une substitution en position C-3 sont désignés par le terme isoflavonoïde.

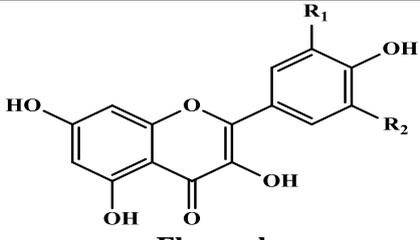
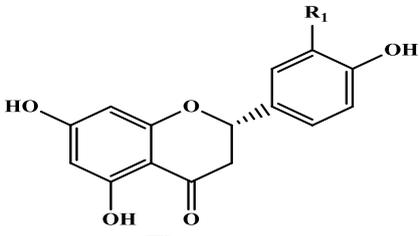
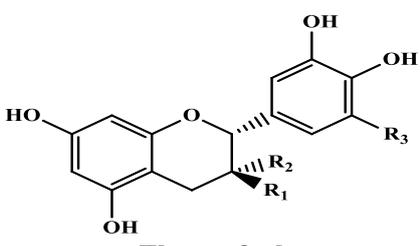
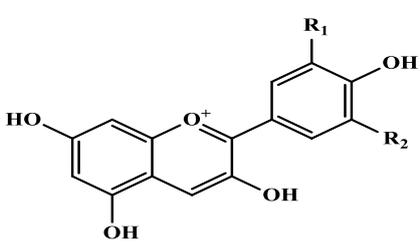
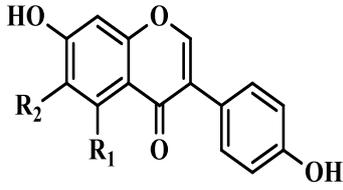
Le groupe des flavonoïdes comprend diverses sous-classes, parmi lesquelles : les flavonols, les flavones, les flavanols, les anthocyanidines, les flavanones et les isoflavones (**tableau 4**). Ces dernières sont les composés alimentaires les plus importants.

Les flavones et flavonols sont les composés flavoniques les plus répandus dans le règne végétal. Cependant les dihydroflavonols (dihydrokaempférol, dihydroquercétine) et les dihydroflavane-3,4-diols (leucopélargonidol, leucocyanidol) sont considérés comme des flavonoïdes minoritaires en raison de leur distribution naturelle restreinte (**Ghedira, 2005**).

Tableau 4: Différents types de flavonoïdes (**Tsao, 2010 ; Elhadi et Carrillo-Lopez, 2019**).

Classe et Structure chimique	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	Exemples
<p>Flavone</p>	OH	OH	OH	H	OH	H	Lutéoline
	H	OH	OH	H	OH	H	Apigénine
	H	OCH <sub>3</sub>	Tangerétine				
	OCH <sub>3</sub>	Nobiletine					

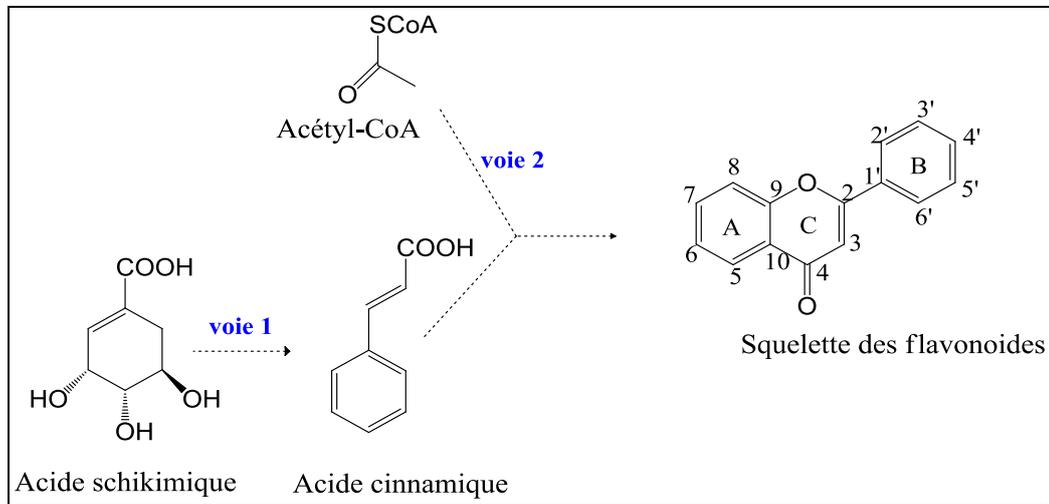
## Synthèse bibliographique

 <p style="text-align: center;"><b>Flavonol</b></p>	OH	H		Quercétine
	H	H		Kaempférol
	OH	OH		Myrecétine
	OCH <sub>3</sub>	H		Isorhamentine
 <p style="text-align: center;"><b>Flavanone</b></p>	H			Naringénie
	OCH <sub>3</sub>			Hesperitine
	OH			
 <p style="text-align: center;"><b>Flavan-3-ol</b></p>	OH	H	H	(+) Catéchine
	H	OH	H	(-) Epicatechine
	OH	H	OH	(+) Gallo catechine
	OG	H	H	(+) Catechinegallate
	OG	H	OH	(+) Gallo catechinegallate
	H	H		
 <p style="text-align: center;"><b>Anthocyanidine</b></p>	OH	H		Cyanidine
	OH	OH		Delphénidine
	OCH <sub>3</sub>	H		Péonidine
	OCH <sub>3</sub>	OH		Petunidine
	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>		Malvidine
	H	H		
 <p style="text-align: center;"><b>Isoflavone</b></p>	OH	H		Genisteine
	H	OCH <sub>3</sub>		Glyciteine

**I.8.2.2. Biosynthèse des flavonoïdes**

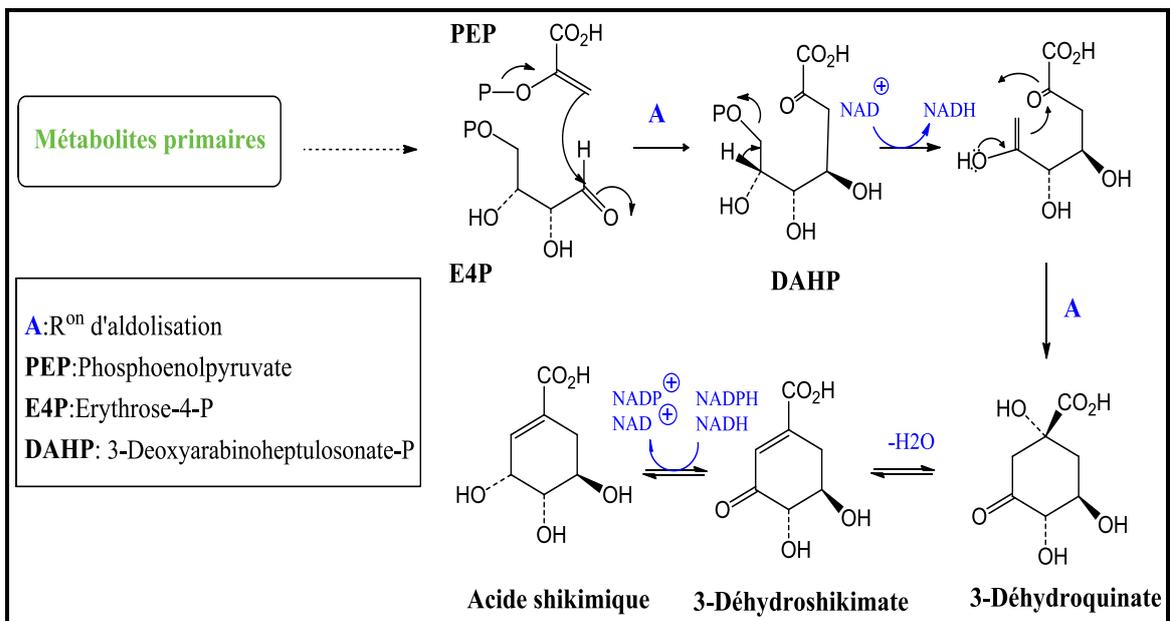
Les flavonoïdes sont synthétisés au niveau du chloroplaste, la membrane du réticulum endoplasmique et dans le cytoplasme, par des réactions enzymatiques hautement contrôlées (Atta, 2018).

La biosynthèse des flavonoïdes dans les systèmes cellulaires passe par deux voies différentes (Nabavi *et al.*, 2020) (Figure 6):



**Figure 6:** Biosynthèse des flavonoïdes

❖ **La voie du shikimate:** est une série des réactions qui conduit à la formation de l'acide shikimique, impliquant la cyclisation des deux métabolites PEP et E4P (Figure 7).



**Figure 7:** Biosynthèse de l'acide shikimique

En effet, la phénylalanine est un intermédiaire métabolique entre l'acide shikimique et l'acide cinnamique, le précurseur commun de *p*-coumaroyl-CoA (Jiang et Zhang, 2016) (Figure 8).

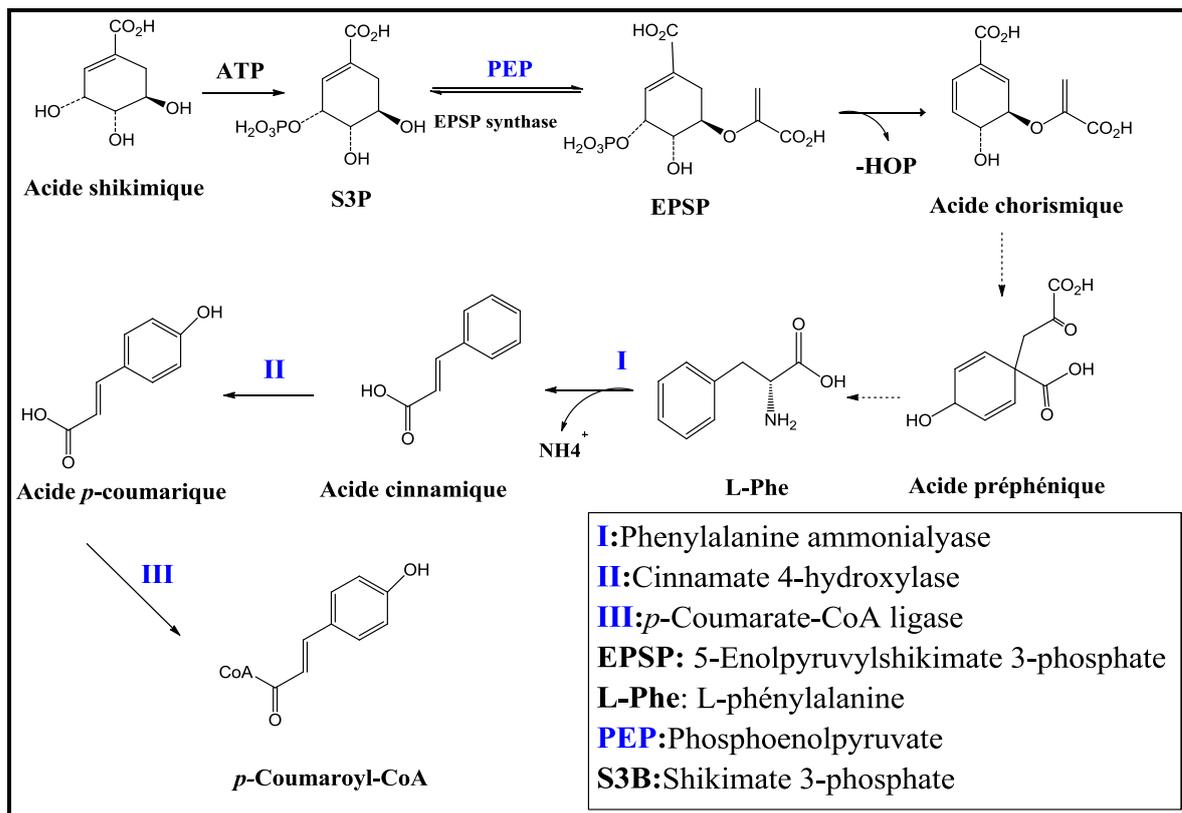


Figure 8: Biosynthèse du *p*-coumaroyl-CoA

❖ La voie d'acétate

Le malonyl-CoA est généré via les transformations du glucose (Nabavi *et al.*, 2018) (Figure 9).

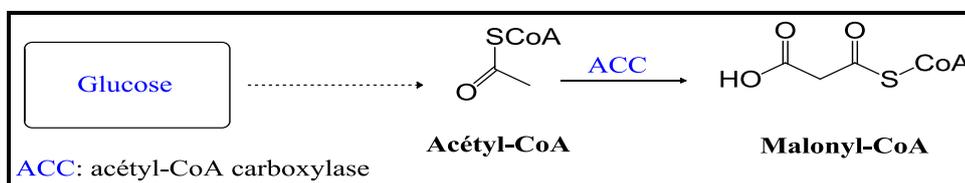


Figure 9: Biosynthèse du malonyl-CoA

La dernière étape dans cette biosynthèse est la condensation de trois unités de malonyl-CoA avec *p*-coumaroyl-CoA, pour donner la tétrahydroxychalcone et trihydroxychalcone. Cette réaction est catalysée par des enzymes.

Les deux molécules de base permettront ensuite, via différentes réactions enzymatiques, la synthèse des différentes classes de flavonoïdes (Winkel-Shirley, 2002) (Figure 10).

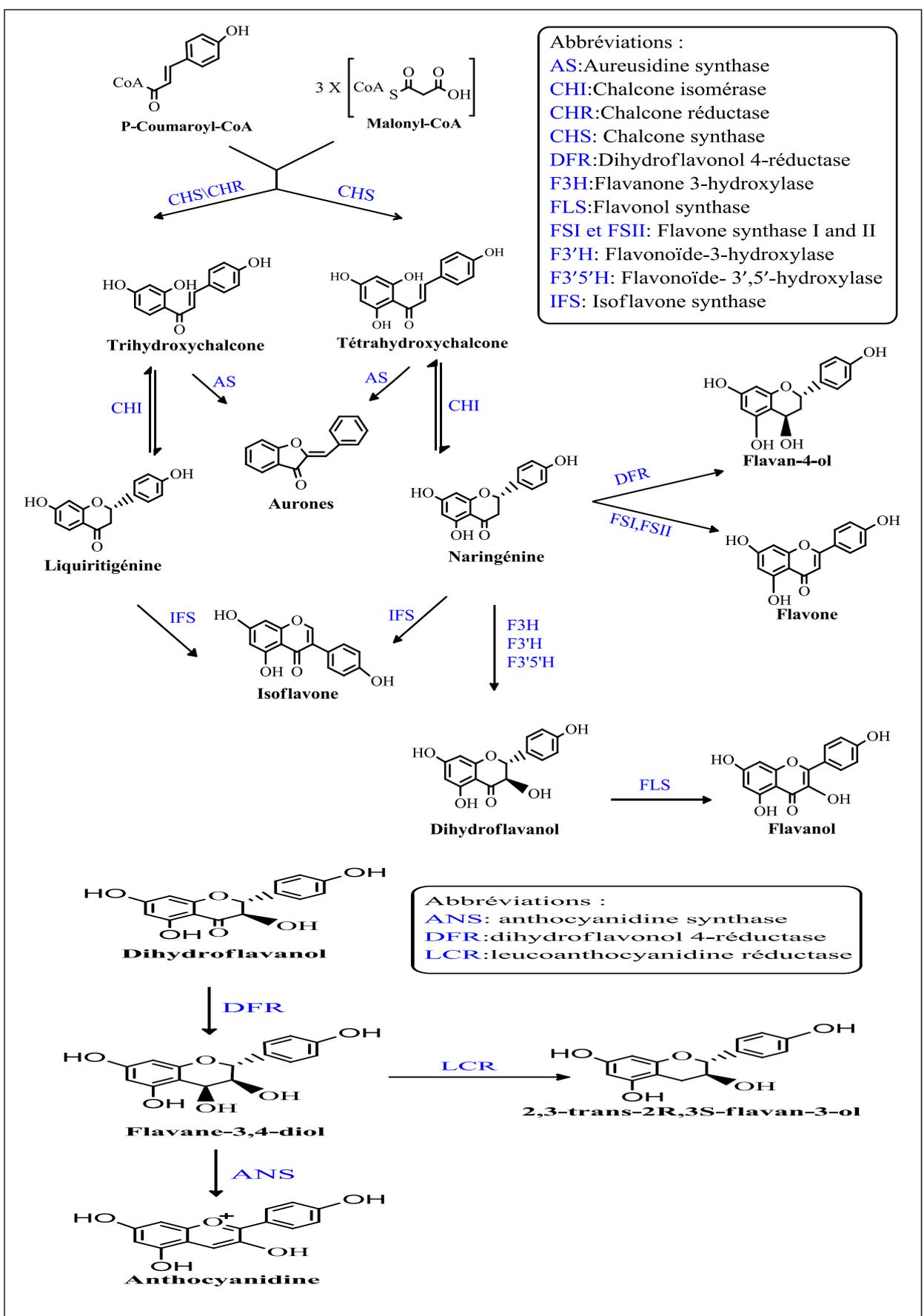
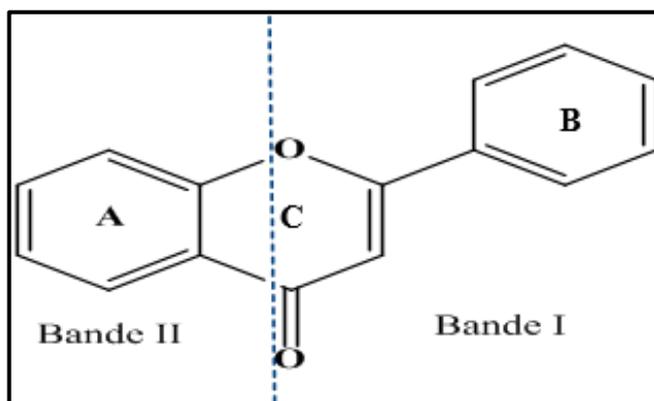


Figure 10: Schéma récapitulatif de la biosynthèse des différentes classes de flavonoïdes

### I.8.2.3. Caractéristiques physico-chimiques des flavonoïdes

#### I.8.2.3.1. Absorption des rayonnements UV

Des études sur les flavonoïdes par spectroscopie UV (**Santos *et al.*, 2017**), ont montré que la plupart des flavonoïdes consistent en deux bandes maximum d'absorption: bande II (240–285 nm) qui correspond au système benzoyle du cycle A, tandis que la bande I (300–400 nm) représente le système cinnamoyle du cycle B (**Figure 11**).



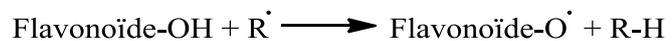
**Figure 11:** Groupements caractéristiques d'un squelette flavonique

#### I.8.2.3.2. Solubilité des flavonoïdes

Les solvants polaires sont généralement utilisés pour extraire des flavonoïdes à partir du matériel végétal. Les solvants les plus appropriés sont les mélanges aqueux contenant l'éthanol, le méthanol, l'acétone et l'acétate d'éthyle. L'éthanol est connu pour être un bon solvant pour l'extraction des flavonoïdes et sans danger pour la consommation humaine. Le méthanol s'est généralement révélé plus efficace pour l'extraction des flavonoïdes aglycones, tandis que l'acétone aqueux est bon pour l'extraction de flavanols glycosylés. Cependant, la structure chimique du squelette des flavonoïdes et le poids moléculaire des flavonoïdes peuvent modifier leurs solubilités dans de nombreux solvants polaires et non polaires (**Atta, 2018**).

### I.8.3. Activités biologiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés bioactifs connus pour leurs propriétés biologiques. De nombreuses études antérieures ont reporté le pouvoir antioxydant des flavonoïdes et leur capacité de neutraliser les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle fortement réactif selon la réaction suivante :



Les flavonoïdes sont capables d'inhiber la carcinogenèse, l'angiogenèse, la prolifération cellulaire et la métastatique des cellules tumorales. Ils sont également capables de chélater les ions métalliques, qui peuvent renforcer ces effets délétères par la production des radicaux hydroxyles.

Les flavonoïdes pourraient exercer d'autres activités biologiques, notamment des propriétés vasculoprotectrices, anti-inflammatoires, antiallergiques, anti-hépatotoxiques, antiulcéreuses, antibactériennes, antivirales et anti-tumorales. Ils préviennent aussi la cataracte diabétique.

De plus, des études épidémiologiques, appuient les effets protecteurs des aliments et des compléments alimentaires riches en flavonoïdes contre les maladies cardiovasculaires, et certaines infections virales tels que le virus respiratoire syncytial (**Ghedira, 2005**).

# Matériel et méthodes

---

## II.1. Matériel végétal

La plante *Ephedra altissima* a été sélectionnée sur la base de son utilisation en médecine traditionnelle et sa richesse en métabolites secondaires notamment en flavonoïdes.

La récolte du matériel végétal a été réalisée durant la période du mois de novembre 2016, dans la région de Bouhmama à Khenchla (région des Aurès).

*Ephedra altissima* Desf. est identifiée par le professeur Bachir Oudjehih du département d'Agronomie de l'institut des Sciences Vétérinaires et Agronomiques de l'Université Batna-1.

## II.2. Extraction

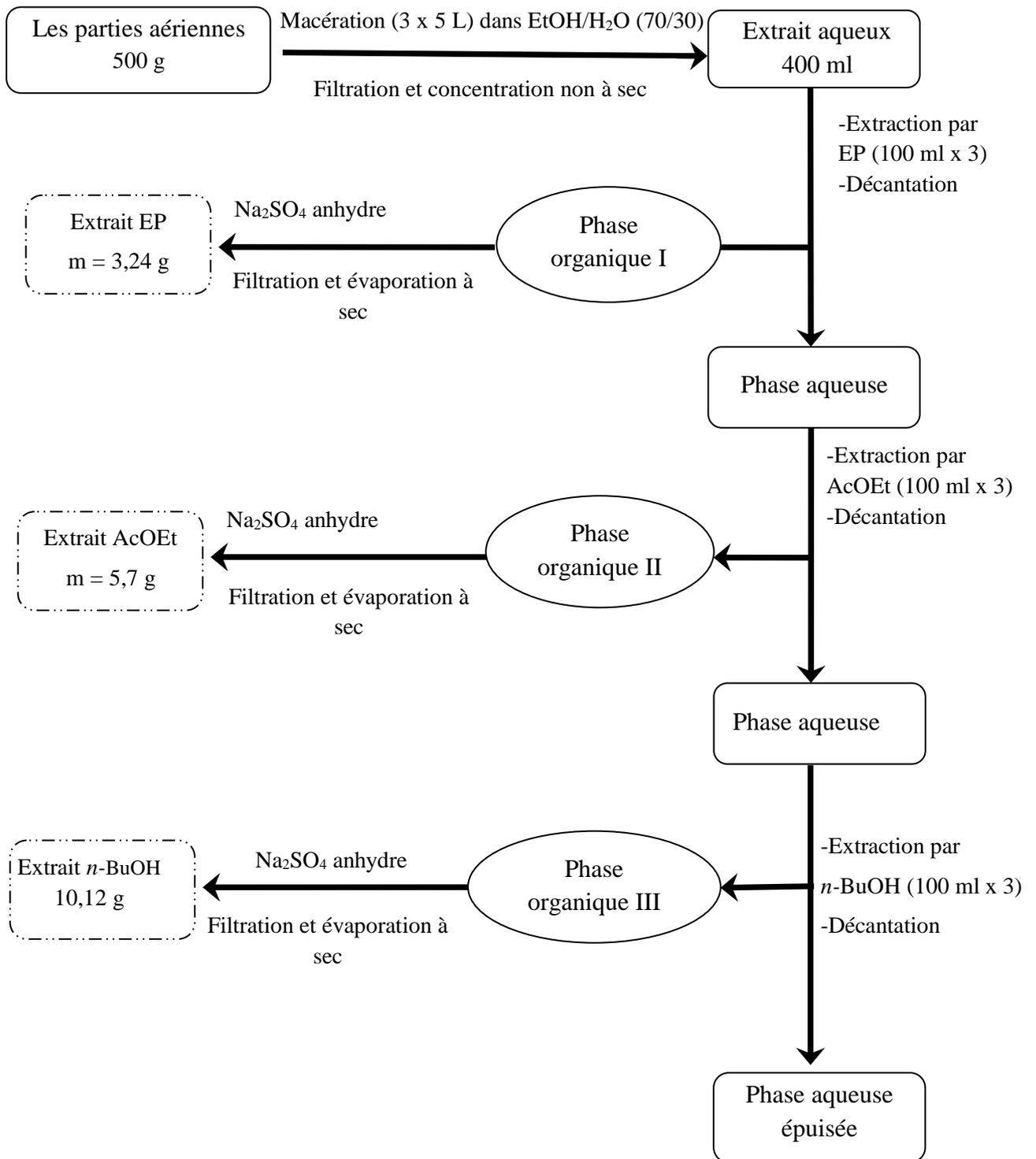
Les parties aériennes de la plante *Ephedra altissima* (500 g) sont séchées et broyées finement puis mises à macérer dans le mélange (EtOH/H<sub>2</sub>O:70/30). La procédure est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant.

Après filtration et concentration non à sec à 40 °C, la phase aqueuse hydroethanolique obtenue (400 ml) est soumise à des extractions liquide-liquide, en utilisant successivement des solvants organiques à polarité croissante l'éther de pétrole (3 x 100 ml), l'acétate d'éthyle (3 x 100 ml) et le *n*-butanol (3 x 100 ml). Les trois phases organiques récupérées sont séchées sur sulfate de sodium (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) anhydre puis filtrées et concentrées à sec sous pression réduite. Ceci a donné 3,24 g de l'extrait éther de pétrole, 5,7 g de l'extrait acétate d'éthyle et 10,12 g de l'extrait *n*-butanolique. Les différentes étapes d'extraction sont présentées dans le schéma ci-dessous (**Figure 12**).

## II.3. Calcul de rendement

Le rendement d'extraction est le rapport entre la quantité de l'extrait après évaporation et la quantité de la poudre végétale utilisée.

**Rendement d'extraction (%)** = (poids d'extrait obtenu / poids pris du matériel végétal) × 100



**Figure 12:** Schéma général de l'extraction des parties aériennes de la plante *Ephedra altissima*

## II.4. Analyse qualitative

### II.4.1. Screening phytochimique

La présence ou l'absence de différentes classes de métabolites secondaires contenues dans les extraits bruts ont été qualitativement testés en utilisant les méthodes décrites par (Fransworth, 1966).

#### I.4.1.1. Flavonoïdes

Dans un tube à essai, 5 ml d'extrait brut (EP, AcOEt et *n*-BuOH) ont été introduits avec quelque goutte de l'acide acétique ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), 5 ml d'eau distillée et 5 ml d'acide chlorhydrique concentré (HCl), après agitation quelques gouttes d'alcool isoamylique et 0,5 g de copeaux de magnésium sont ajoutés. La coloration rose-orange, rouge ou rouge violet indique la présence des flavonoïdes.

#### I.4.1.2. Quinones

1 ml de chaque extrait (EP, AcOEt et *n*-BuOH) a été ajouté à 0.5 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH 1%). L'apparition d'une coloration rouge indique la présence de quinones dans l'extrait.

#### I.4.1.3. Stéroïdes et terpènes

2 ml de chaque extrait ont été ajoutés à 2 ml de chloroforme, 0,5 ml d'anhydride acétique et trois gouttes d'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) concentré. L'apparition d'une couleur bleue révèle la présence des stéroïdes et l'observation d'une couleur rouge témoigne de l'existence des terpenoïdes.

#### I.4.1.4. Caroténoïdes

Dans un tube à essai, introduire 3 ml d'extrait (EP, AcOEt et *n*-BuOH), 3 ml d'HCl concentré et 3 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . L'apparition d'une couleur bleu-vert indique la présence des caroténoïdes.

#### I.4.1.5. Alcaloïdes (Test de Dragendorff)

Trois à quatre gouttes de réactif de Dragendorff ont été ajoutés à 1 ml d'extrait testé. L'apparition d'un précipité rouge-orangé révèle la présence des alcaloïdes.

#### I.4.1.6. Tannins

1ml de chaque extrait a été ajouté à 0,5 ml de chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ , 1%). L'observation d'une couleur verdâtre ou bleu noirâtre est en faveur la présence de tanins galliques et l'apparition d'une couleur brune verdâtre supporte l'existence des tanins catéchiques.

#### **I.4.1.7. Coumarines (Test de fluorescence sous lampe UV)**

1 ml de chaque extrait a été traité par 0,5 ml d'une solution d'hydroxyle d'ammonium (NH<sub>4</sub>OH à 25%). L'observation d'une fluorescence intense sous la lumière UV à 365 nm indique la présence des coumarines.

#### **I.4.1.8. Saponines**

10 ml d'eau distille sont ajoutées à 3 ml de l'extrait aqueuse, après une agitation vigoureuse le mélange est laissé pendant 20 minutes. La formation d'une mousse de 1 cm d'hauteur suggère la présence des saponines.

#### **I.4.1.9. Anthraquinones**

50 µg de chaque extrait brut ont été agités avec 1 ml de chloroforme. Le mélange a été filtré puis 500 µL d'une solution d'ammoniaque (10%) ont été ajoutés au filtrat. La solution résultante a été agitée, et après repos, deux couches ont été formées. L'apparition d'une coloration rose ou rouge dans la couche alcaline inférieure temoigne de la présence des anthraquinones.

### **II.5. Analyse quantitative**

#### **II.5.1. Dosage des polyphénols totaux**

La teneur en polyphénols totaux des extraits bruts de la plante *E. altissima* a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu décrite par **Li et ses collaborateurs, (2007)**. Cette méthode est basée sur la réduction des acides phosphomolybdiques et phosphotungstiques du réactif de Folin-Ciocalteu par les phénols présents dans l'extrait à analyser dans un milieu alcalin.

200 µl de chaque extrait (EP, AcOEt et *n*-BuOH) à différentes concentrations ont été ajoutés à 1 ml du réactif de Folin-Ciocalteu (1/10). Après 4 min, 800 µl de carbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 7,5 %) ont été additionnés. Le mélange a été incubé pendant 2 heures à température ambiante et à l'obscurité. L'absorbance est mesurée à 765 nm contre un blanc en utilisant un spectrophotomètre UV-Vis (7220G). L'acide gallique (0-200 µg/ml) est utilisé pour établir la courbe d'étalonnage à partir de laquelle la concentration des polyphénols totaux des extraits est calculée. Les résultats sont exprimés en microgrammes équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG/mg d'extrait).

### II.5.2. Dosage des flavonoïdes

La méthode colorimétrique du trichlorure d'aluminium (**Turkoglu et al., 2007**) a été utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits de plantes. Elle est basée sur la capacité des flavonoïdes à former des complexes de couleur jaunâtre avec les chlorures d'aluminium.

1 ml d'une solution de chlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>, 2%) a été ajouté à 1 ml de l'échantillon (extraits ou standard) à différentes concentrations. Le mélange est incubé pendant 10 min à température ambiante puis la lecture est faite à 430 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. La teneur en flavonoïdes dans les extraits a été calculée à partir de la gamme d'étalonnage établie par la quercétine (2,5-40 µg/ml) et les résultats sont exprimés en microgrammes équivalents de la quercétine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg d'extrait).

### II.5.3. Dosage des tanins condensés

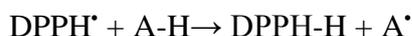
La quantification des tanins condensés a été déterminée selon la méthode de **Schofield et al., (2001)**. Cette technique est basée sur la formation d'un complexe rouge entre la vanilline et les tannins.

3 ml d'une solution de vanilline (4%) et 1,5 ml d'acide hydrochlorique concentré ont été ajoutés à 400 µl de chaque échantillon ou standard. Après 15 min d'incubation l'absorbance est lue à 500 nm. La concentration des tanins condensés a été déterminée à partir d'une gamme d'étalonnage établie par la catéchine (0-400 µg/ml) et les résultats sont exprimés en microgramme équivalents de la catéchine par milligramme d'extrait (µg ECT/mg d'extrait).

## II.6. Activités antioxydantes

### II.6.1. piégeage des radicaux libres DPPH

L'activité anti-radicalaire des différents extraits (EP, AcOEt et *n*-BuOH) a été testée spectrophotométriquement par le piégeage des radicaux libres DPPH (**Blois, 1958**). Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH<sup>•</sup>) est un radical libre stable de couleur violette en solution présentant une absorbance caractéristique entre 512 et 517 nm. Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH<sup>•</sup> est réduit en diphényle picryl-hydrazine par un antioxydant. La forme réduite de couleur jaune n'absorbe plus à 517 nm, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants (**sanchez-moreno, 2002**).



Où A-H représente un composé capable de céder un H<sup>•</sup> au radical DPPH (violet) pour le transformer en diphényle picryl hydrazine (jaune).

25 µl de différentes dilutions des échantillons (extraits ou standards) ont été ajoutés à 975 µl de solution de DPPH préparé dans le méthanol. Le blanc a été préparé en ajoutant 25 µl de méthanol à 975 µl de la solution de DPPH. L'absorbance a été mesurée par un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 517 nm après 30 min d'incubation à température ambiante et à l'obscurité. Le pourcentage d'inhibition du DPPH est établi par l'équation suivante:

$$\text{Activité antiradicalaire\%} = [(Ab_{\text{contrôle}} - Ab_{\text{échantillon}}) / Ab_{\text{contrôle}}] \times 100$$

**Ab<sub>contrôle</sub>**: l'absorbance du blanc, **Ab<sub>échantillon</sub>**: l'absorbance du contrôle positif ou de l'échantillon.

L'activité de piégeage des radicaux libres a été estimée en tant que pourcentage d'inhibition (%). Les résultats sont exprimés en IC<sub>50</sub>, ce dernier représente la concentration inhibitrice de l'extrait à piéger 50% des radicaux DPPH dans le mélange réactionnel dont l'activité la plus forte correspond à l'IC<sub>50</sub> la plus faible (**Ionuț et al., 2018**).

Pour mieux caractériser le pouvoir anti-radicalaire, deux autres paramètres ont été calculés l'EC<sub>50</sub> et l'APR (**Prakash et al., 2007**) où :

**EC<sub>50</sub>** : Concentration effective à 50 %, qui prend en considération la concentration de DPPH dans le milieu réactionnel.

$$EC_{50} = (IC_{50} / \mu\text{g de DPPH/ml})$$

**APR** : Le pouvoir anti-radicalaire relatif qui est inversement proportionnel à l'EC<sub>50</sub>. Plus ces valeurs s'éloignent du zéro, plus la puissance antioxydante augmente.

$$(\text{APR} = 1/EC_{50})$$

En tant que contrôle positif, nous avons utilisé des antioxydants bien connus, à savoir BHT, BHA et l'acide ascorbique. Chaque valeur est la moyenne ± SD de trois mesures.

### II.6.2. Pouvoir réducteur du fer (FRAP)

Le pouvoir réducteur du fer est déterminé selon la méthode d'**Oyaizu et al., (1986)**. Cette technique repose sur la réduction du fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>) en fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>), qui peut être évalué spectrophotométriquement à 700 nm (**Chung et al., 2002**).

500 µL de chaque extrait ou standards à différentes concentrations ont été ajoutés à 2,5 mL d'une solution tampon phosphate (0,2 M ; pH 6,6) et 2,5 mL d'une solution de ferricyanure de potassium [K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>] à 1%. Après incubation au bain marie à 50 °C pendant 20 minutes, un volume de 2,5 ml d'acide trichloracétique (10%) a été ensuite ajouté puis le

mélange à été centrifugé à 3000 rpm pendant 10 minutes. 2,5 ml du surnageant ont été mélangé avec 2,5 ml d'eau distillée et 500 µL de FeCl<sub>3</sub> (1%) fraîchement préparé dans de l'eau distillée. La lecture de l'absorbance a été faite à 700 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions où l'extrait est remplacé par le méthanol. L'activité antioxydante est calculée par rapport à la droite d'étalonnage de l'acide ascorbique et les résultats sont exprimés en mg d'équivalents de l'acide ascorbique par µg d'extrait (µg EAA /µg d'extrait).

### **II.6.3. Capacité antioxydante totale (CAT)**

La capacité antioxydante totale des extraits bruts (EP, AcOEt et *n*-BuOH) a été évaluée par la méthode de phosphomolybdène décrite par **Prieto *et al*, (1999)**. Cette méthode est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) en molybdène Mo (V) en présence des antioxydants pour obtenir un complexe de phosphomolybdène (**Lu *et al*, 2001**).

100 µl d'extrait sont ajoutés à 900 µl du réactif de molybdate (acide sulfurique 0,6 M, phosphate de sodium 28 mM et 4 mM de molybdate d'ammonium). Les tubes contenant le mélange réactionnel ont été incubés à 95 °C pendant 90 minutes. Après refroidissement, l'absorbance a été mesurée à 695 nm. Un contrôle négatif a été préparé en parallèle en remplaçant l'échantillon par 100 µl de méthanol. L'acide ascorbique est utilisé pour établir la gamme d'étalonnage afin d'estimer la capacité antioxydante des extraits et les résultats sont exprimés en µg équivalents d'acide ascorbique par milligramme d'extrait (µg EAA/mg d'extrait).

### **II.6.4. Capacité antioxydante par réduction de permanganate**

La capacité des extraits bruts à réduire le MnO<sub>4</sub><sup>-</sup> en MnO<sub>4</sub><sup>-2</sup> a été déterminée en utilisant la méthode décrite par **Popović *et al*, (2012)**. 1 ml de chaque échantillon à différentes concentrations a été ajouté à 3 ml de solution de KMnO<sub>4</sub> (80,0 µg/l; pH = 9). Les solutions obtenues ont été incubées à 25 °C pendant 30 min et l'absorbance a été prise à 525 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le blanc a été préparé en remplaçant les échantillons par une solution tampon phosphate. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de piégeage de permanganate en utilisant la formule suivante:

$$\text{Activité (\%)} = [(A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{blanc}}] \times 100$$

$A_{\text{blanc}}$  est l'absorbance de la solution à blanc et  $A_{\text{échantillon}}$  est l'absorbance de l'échantillon. Les expériences ont été réalisées en triple et les résultats ont été transmis comme moyenne (valeurs ± SD).

### II.6.5. Test de blanchissement du $\beta$ -carotène

La capacité anti-oxydante des extraits a été estimée en mesurant l'inhibition de blanchissement du  $\beta$ -carotène par les produits d'oxydation de l'acide linoléique selon la méthode décrite par **Shon *et al*, (2003)**. L'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes qui vont par la suite oxyder le  $\beta$ -carotène et entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie spectrophotométriquement à 470 nm. Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du  $\beta$ -carotène (**Kartal *et al*, 2007**).

L'émulsion de  $\beta$ -carotène /acide linoléique est préparée par solubilisation de 0,2 mg de  $\beta$ -carotène dans 1 ml du chloroforme, 200  $\mu$ l de l'acide linoléique et 200  $\mu$ l de Tween 80. Après évaporation du chloroforme, 50 ml d'eau distillée saturée en oxygène ont été ajoutés. Un volume de 200  $\mu$ l de solution d'extraits (EP, AcOEt et *n*-BuOH) ou antioxydant de référence (BHT) a été ajouté à 5 ml de l'émulsion. L'absorbance à temps zéro a été mesurée immédiatement à 470 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Les tubes ont été ensuite incubés à 50 °C et l'absorbance a été mesurée à nouveau à des intervalles de temps de 20 minutes pendant 2 heures. Le taux de blanchiment au  $\beta$ -carotène a été calculé selon la formule suivante:

$$\text{Taux de blanchiment au } \beta\text{-carotène} = \ln (A_0/A_t) / t$$

Où ln est le logarithme naturel;  $A_0$  est l'absorbance au temps 0;  $A_t$  est l'absorbance au temps t ; t correspond aux temps à 20, 40, 60, 80, 100 et 120 min.

L'activité antioxydante des échantillons a été calculée en pourcentage d'inhibition, en utilisant l'équation:

$$\text{Activité antioxydante (\%)} = [(A_{\text{Blanc}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{Blanc}}] \times 100$$

### II.6.6. Inhibition de la peroxydation lipidique par la méthode au thiocyanate ferrique (FTC)

L'activité antioxydante des extraits a été évaluée par l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique en utilisant la méthode au thiocyanate ferrique **Takao *et al*, (1994)**. Cette méthode est basée sur l'oxydation de  $\text{Fe}^{2+}$  en  $\text{Fe}^{3+}$  par les peroxydes formés au cours de l'oxydation de l'acide linoléique. Les ions  $\text{Fe}^{3+}$  forment un complexe de couleur rouge avec le thiocyanate et ce complexe présente une absorbance maximale à 500 nm (**Chung *et al*, 2002**).

Le mélange réactionnel contenant respectivement 400 µl de chaque extrait (100 µg/ml), 400 µl d'acide linoléique (2,52 % dans l'éthanol absolu) et 800 µl de tampon phosphate (pH 7,4) a été incubé à 40°C pendant 1 heure. Après incubation 100 µl de cette solution ont été ajoutés à 5 ml d'éthanol (70 %) et 100 µl d'ammonium thiocyanate (30 %). Après 3 minutes 100 µl de FeCl<sub>2</sub> (3,5 %) préparé dans une solution d'acide chloridrique (20 mM) ont été ajoutés au milieu réactionnel. Un blanc a été réalisé en remplaçant les extraits par de l'eau distillée. L'absorbance de la coloration rouge résultant de la solution, est lue pendant 7 jours à 500 nm.

Le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = [1 - (\text{DO}_{\text{essai}} / \text{DO}_{\text{blanc}})] \times 100$$

DO<sub>blanc</sub> correspond à l'absorbance du blanc et DO<sub>essai</sub> est l'absorbance de l'échantillon. Les expériences ont été réalisées en triple et les résultats sont exprimés sous forme de moyenne (valeurs ± SD).

#### **II.6.7. Piégeage du peroxyde d'hydrogène**

La capacité des extraits d'*Ephedra altissima* à piéger le peroxyde d'hydrogène a été déterminée selon la méthode de **Ruch *et al.*, (1989)**. Cette technique repose sur l'absorption du peroxyde d'hydrogène dans le domaine de l'UV et comme la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diminue en présence des antioxydants, la valeur d'absorbance de ce dernier à 230 nm diminue également (**Malgalhaes *et al.*, 2008**).

Une solution de peroxyde d'hydrogène (40 mM) a été préparée dans un tampon phosphate (pH 7,4). Un volume de 1 ml de l'extrait (100 µg/ml) a été ajouté à 600 µl de solution de peroxyde d'hydrogène. L'absorbance de l'échantillon a été mesurée à 230 nm après 10 minutes d'incubation. Le blanc contenant une solution de tampon phosphate sans H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et l'acide ascorbique est utilisé comme antioxydant standard.

Le pourcentage de piégeage de peroxide d'hydrogène par l'extrait ou le standard est calculé selon la formule suivante :

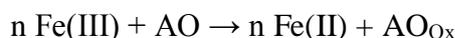
$$\text{Activité de piégeage des radicaux libres H}_2\text{O}_2 \text{ (\%)} = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100.$$

A<sub>C</sub> : l'absorbance de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A<sub>E</sub> : l'absorbance de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence de l'extrait ou standard.

### II.6.8. Activité antioxydante par potentiométrie

L'activité antioxydante par potentiométrie est basée sur les interactions chimiques entre les antioxydants présents dans les extraits bruts et le système médiateur  $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$  conduisant à un transfert d'électrons en raison d'un changement dans le rapport de concentration des formes oxydées et réduites:



Où AO: antioxydants présents dans l'extrait aqueux;  $\text{AO}_{\text{Ox}}$ : forme oxydée d'antioxydants; n: nombre d'électrons impliqués dans la réaction. L'activité antioxydante (AOA) a été calculée en mol-eq/l (M eq) comme suit:

$$\text{AOA} = \frac{C_{\text{ox}} - \alpha C_{\text{red}}}{1 + \alpha}; \alpha = (C_{\text{ox}}/C_{\text{red}}) 10^{(E_1-E_0)nF/2.3RT}$$

Où  $E_0$  est le potentiel mesuré dans le système avant l'ajout de la solution d'échantillon;  $E_1$ : potentiel mesuré dans le système après l'addition de la solution échantillon;  $C_{\text{ox}}$ : concentration de la forme oxydée du système médiateur dans la cellule;  $C_{\text{red}}$ : concentration de la forme réduite du système médiateur dans la cellule;  $n$  est le degré de dilution;  $F$ : constante de Faraday;  $R$ : constante universel de gaz ( $\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ );  $T$ : température (K).

Pour préparer le système médiateur, 9,8 ml de solution tampon phosphate (pH 7,4) ont été ajoutés à 100  $\mu\text{l}$  de  $K_3[Fe(CN)_6]$  (1,0 M) et 100  $\mu\text{l}$  de  $K_4[Fe(CN)_6]$  (0,01 M). La solution obtenue a été placée dans une cellule électrochimique et le potentiel initial de l'électrode de platine a été mesuré ( $E_0$ ). Ensuite, 200  $\mu\text{l}$  d'extrait aqueux dilué ont été introduits dans la cellule électrochimique. Le mélange a été agité et le changement potentiel a été mesuré. La valeur obtenue a été enregistrée comme  $E_1$  (**Brainina et al., 2019**). Chaque expérience a été réalisée en triple et les résultats ont été décrites en moyenne (valeurs  $\pm$  SD).

### II.7. Activité anti-arthritique

L'évaluation *in vitro* de l'activité anti-arthritique des extraits (EP, AcOEt et *n*-BuOH) de l'espèce *E. altissima* a été réalisée par la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines (**Karthik et al., 2013**) en utilisant l'ibuprofène comme standard.

500  $\mu\text{l}$  de chaque extrait ou standard à différentes concentrations ont été ajoutés à 500  $\mu\text{l}$  d'une solution de sérum albumine bovine (BSA ; 0,2 %) préparée dans le tampon Tris-salin (pH 6,6). Un contrôle négatif contenant le mélange de 500  $\mu\text{l}$  de BSA et 500  $\mu\text{l}$  d'éthanol est préparé en parallèle. Les tubes résultant sont incubés à 37 °C pendant 10 minutes, puis

chauffés à 72 °C durant 5 minutes. Après refroidissement, l'absorbance a été lue à 660 nm. Les expériences ont été réalisées en triple (valeurs  $\pm$  SD) et le pourcentage d'inhibition de la dénaturation a été déterminé par la formule suivante:

$$\text{Inhibition de la dénaturation (\%)} = [(A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{Echantillon}}) / A_{\text{Contrôle}}] \times 100$$

## II.8. Activité inhibitrice de la lipase pancréatique

L'activité inhibitrice de la lipase pancréatique a été évaluée par la méthode de **Kim et al, (2009)**. Un tampon enzymatique a été préparé par addition de 20  $\mu$ l d'une solution de lipase pancréatique des porcines (20 mg/ml dans du tampon TRIS, pH 7) à 160  $\mu$ l de tampon Tris (100 mM Tris-HCl et 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,0). Ensuite, des concentrations croissantes de chaque extrait allant de (0 à 12 mg/ml) dissous dans le tampon TRIS ont été mélangées avec 20  $\mu$ l du tampon enzymatique et incubées pendant 30 min à 37 °C. 20  $\mu$ l de substrat (p-NPB dans le diméthylformamide 10 mM) ont été ensuite ajoutés. L'activité de la lipase a été déterminée en mesurant l'hydrolyse du p-NPB en p-nitrophénol à 405 nm à l'aide d'un lecteur ELISA. L'inhibition de l'activité de la lipase a été exprimée en pourcentage de diminution de l'absorbance lorsque la lipase pancréatique a été mise en incubation avec les composés d'essai. L'inhibition de la lipase (%) a été calculée selon la formule suivante:

$$\text{Activité inhibitrice (I \%)} = [(A - B) / A] \times 100$$

Où A est l'activité de la lipase dans la solution de réaction sans échantillon et B est l'activité de la lipase dans la solution de réaction contenant l'échantillon. Les mesures ont été effectuées en triple et les valeurs de l'IC<sub>50</sub> (concentration inhibitrice à laquelle 50% de l'activité enzymatique est inhibée) ont été déterminées à partir des courbes du pourcentage d'inhibition en fonction de concentration.

## II.9. Activité inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase

L'inhibition de l' $\alpha$ -amylase pancréatique a été réalisée par la méthode de **Kwon et al, (2007a)**. 200  $\mu$ l d'une solution d'échantillon (extrait ou standard) ont été ajoutés à 500  $\mu$ l de tampon phosphate de sodium (0,02 M, pH 6,9 avec 0,006 M de NaCl) contenant une solution d' $\alpha$ -amylase à une concentration de 0,5 mg/ml. Le mélange a été incubé à 25 °C pendant 10 minutes. Ensuite, 500  $\mu$ l d'une solution d'amidon (1% dans du tampon phosphate de sodium à 0,02 M) ont été ajoutés. Le mélange réactionnel a été incubé à 25 °C pendant 10 min et la réaction a été arrêtée par addition de 1 ml d'acide dinitrosalicylique. Ensuite, le mélange a été incubé dans un bain d'eau bouillante pendant 5 minutes puis refroidie à température ambiante. Après refroidissement, le mélange a été dilué avec 10 ml d'eau distillée et l'absorbance a été

mesurée à 540 nm. L'acarbose a été utilisé comme contrôle positif et le pourcentage d'inhibition a été calculé comme suit:

$$\text{L'inhibition (\%)} = [(A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{Echantillon}}) / A_{\text{Contrôle}}] \times 100$$

## II.10. Digestion gastro-intestinale *in vitro*

La bouche, l'estomac et l'intestin grêle sont des compartiments du tractus gastro-intestinal qui déterminent la bioaccessibilité de tous les nutriments. Il a été établi la composition des solutions digestives qui imitent la variété des niveaux digestifs dans la physiologie humaine (Boyer *et al.*, 2005). 5 mg de chaque extrait ont été homogénéisés avec 10 ml d'une solution semblable à la salive comprenant l' $\alpha$ -amylase, puis incubés dans un bain-marie avec agitation pendant 5 min à 37°C (mouth-like digestion) ; les échantillons ont ensuite été acidifiés à pH 2,0 avec HCl avant l'ajout de pepsine (200 mg dans 5 ml d'HCl 0,1 M) et incubés sous agitation pendant 1 h à 37 ° C (gastric-like digestion); ensuite, le pH a été augmenté jusqu'à 5,5–6,0 avec du NaHCO<sub>3</sub> (1M), puis la pancréatine (4 mg/mL), et un extrait de bile (25 mg/mL) ont été ajoutés, le mélange a été mis en incubation avec agitation pendant 2 h à 37 ° C (small intestinal-like digestion). Des aliquotes ont été prélevés au milieu et à la fin de chaque processus digestif, refroidis rapidement sur la glace puis lyophilisés. Des contrôles sans enzymes digestives ont été effectués en parallèle. Seules les aliquotes obtenues à la fin de la digestion de l'intestin grêle ont été utilisées pour tester l'activité anti-radicalaire par le test ABTS et le pouvoir réducteur du fer.

### II.10.1. piégeage des radicaux libres ABTS

La capacité antioxydante des extraits bruts à piéger le radical ABTS<sup>•+</sup> a été testée selon le protocole décrit par Bibi Sadeer *et al.*, (2020). Le radical ABTS<sup>•+</sup> est produit en mélangeant un volume égal de solution ABTS (7 mM) avec du persulfate de potassium (2,45 mM). Le mélange est laissé à l'obscurité à une température ambiante pendant 12 à 16 h avant l'utilisation. La solution obtenue est diluée avec de l'éthanol jusqu'à une absorbance de  $0,70 \pm 0,02$  à 734 nm.

13  $\mu$ l de l'échantillon à différentes concentrations ont été ajoutés à 187  $\mu$ l de solution ABTS<sup>•+</sup> et l'absorbance a été lue à 734 nm après 6 min. L'activité de piégeage des radicaux ABTS<sup>•+</sup> des extraits testés a été calculée selon la courbe d'étalonnage établie en utilisant le Trolox comme standard et les résultats ont été exprimés en  $\mu$ mol équivalents de Trolox par gramme d'extrait sec ( $\mu$ mol TE / g d'extrait sec). Toutes les mesures ont été effectuées en triple pour chaque échantillon.

### II.10.2. Le pouvoir réducteur du fer

Le pouvoir réducteur du fer a été déterminé selon la méthode de **Psarra *et al*, (2002)** avec quelques modifications.  $\text{FeCl}_3$  a été utilisé comme oxydant. L'ion  $\text{Fe}^{2+}$  produit à partir de la réaction d'oxydoréduction forme un produit coloré avec le 2,2'-dipyridyle. Dix microlitres de chaque extrait, standard et leurs dilutions, ainsi que 10  $\mu\text{l}$  de  $\text{FeCl}_3$  à 6 mM dans de l'acide citrique à 5 mM ont été placés dans trois puits de microplaques. Pour chaque échantillon, un blanc sans  $\text{FeCl}_3$  a été inclus. Après 20 min d'incubation à 50°C, 180  $\mu\text{l}$  d'une solution de dipyridyle à 5 g/l dans 1,2% d'acide trichloroacétique ont été ajoutés à chaque puits. Ensuite, après 30 min l'absorbance a été lue à 490 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques. Les résultats sont exprimés en millimoles de Trolox équivalent (TE) de la capacité antioxydante par kg de l'échantillon en utilisant une courbe d'étalonnage établie avec la Trolox.

### II.11. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des extraits a été estimée en terme de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits à tester vis-à-vis de sept souches bactériennes qui sont: *Escherichia Coli* (CIP 7624), *Escherichia Coli* (DSM 1103), *Escherichia Coli* (ATTC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (DMS 1117), *Staphylococcus aureus* (ATTC 25923), *Streptococcus pneumoniae* (ATTC 49619) et *Streptococcus mutans* (ATTC 25175).

#### II.11.1. Vérification de la pureté des bactéries

Les bactéries utilisées sont purifiées sur le milieu nutritif Mueller-Hinton, par striation des quatre quadrants dans des conditions d'asepsie et à des températures optimales selon la souche considérée pendant 24 h à 37 °C.

#### II.11.2. Préparation de l'inoculum

Les souches bactériennes ont étéensemencées sur la gélose Mueller-Hinton puis incubées à 37 °C pendant 24 h, pour optimiser leur croissance. A l'aide d'une anse de platine, on racle quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes, puis on décharge l'anse dans 5 ml de bouillon nutritif pour obtenir la suspension bactérienne. Cette dernière est homogénéisée puis incubée pendant 10-24 h à 37 °C.

Une lecture de la densité optique (DO) de 1 ml d'inoculum a été réalisée par un spectrophotomètre à 625 nm. Son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland ou à une DO entre (0,08-0,10) à 625 nm. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture cellulaire s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort (**CASFM, 2018**).

### II.11.3. Réalisation des tests antibactériens

#### ➤ **Protocol**

Selon la méthode de diffusion en milieu solide (CASFM, 2018), le contact entre une bactérie et l'échantillon à tester doit être sur un milieu gélosé. Le milieu solide est représenté par le milieu de Mueller-Hinton stérilisé par autoclavage à 121°C pendant 20 min.

L'ensemencement des bactéries sur la surface de la gélose est réalisé par écouvillonnage. Un écouvillon a été trempé dans la suspension bactérienne, puis l'essorer en pressant fermement sur la paroi interne du tube. L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrées. Cette opération a été répétée deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois. L'écouvillon est rechargé à chaque fois qu'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri avec la même souche.

Les disques imprégnés de 10 µl de la solution à tester ont été déposés délicatement sur la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile. De même les antibiogrammes réalisés avec des disques contenant des antibiotiques appropriés prêts à l'emploi (témoin positif) et des disques de DMSO (témoin négatif) ont été utilisés pour la comparaison avec les résultats des extraits testés. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 37 °C. Les essais ont été effectués en triple (trois boîtes pour chaque concentration d'extrait et pour chaque souche).

#### ➤ **Estimation de l'activité antibactérienne des extraits**

Les différents extraits organiques de la plante *E. altissima* sont solubilisés dans le DMSO à raison de 100 mg/ml. Ces solutions nous permettent la préparation de différentes concentrations avec des dilutions successives au demi (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 µg/ml), afin de déduire les paramètres d'activités antibactériennes pour chaque extrait.

#### ➤ **Détermination des CMI**

Pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI), il suffit de déterminer les plus petites concentrations auxquelles les extraits présentent encore une activité antibactérienne visible à l'œil nu.

### II.12. Analyses statistiques

L'étude statistique a été réalisée par les logiciels Graph Pad Prism 5 et Excel. Toutes les expériences sont performées en triple et les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$ SD. Les résultats sont analysés par le test Anova univarié suivie du test Dunnet /Tukey pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification. Les valeurs de  $p \leq 0,05$  sont considérées statistiquement significatives. Les valeurs de la concentration inhibitrice à 50% (IC<sub>50</sub>) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir des courbes.

## **II.13. Méthodes d'investigation phytochimique**

### **II.13.1. Méthodes chromatographiques**

#### **II.13.1.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)**

La chromatographie sur couche mince (CCM) est basée essentiellement sur des phénomènes d'adsorption et sur le principe de la capillarité. Elle permet de visualiser le profil général des métabolites secondaires présents dans un extrait ou une fraction.

Les analyses sur couche mince sont réalisées en phase normale sur des plaques d'aluminium Kieselgel 60 F<sub>254</sub> Merck, 250 µm (20 x 20 cm). Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec l'éluant. La phase mobile est constituée en général d'un mélange de solvants. Les CCM sont analysées en lumière visible et sous UV (254 et 365 nm), avant et après révélation par : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/acide acétique/eau (25:25:50).

#### **II.13.1.2. Chromatographie sur couche préparative (CCE)**

La chromatographie sur couche épaisse est basée sur le même principe de la chromatographie sur couche mince mais dans un but de purification.

Les séparations sont réalisées sur des plaques en verre de silice (20 x 20 cm). Après migration de la phase mobile à 0,5 cm du bord supérieur de la plaque, la partie contenant le composé voulu est récupérée, mise en suspension, puis centrifugée pour séparer le composé de la silice. Ensuite, le solvant est éliminé par évaporation, pour obtenir un produit sec.

#### **II.13.1.3. Chromatographie liquide sous vide (VLC)**

La chromatographie liquide sous vide est une technique beaucoup plus rapide, simple et moins consommatrice de solvants que les autres méthodes chromatographiques classiques. La rapidité de cette méthode évite les phénomènes d'isomérisation observés souvent dans le cas de la chromatographie sur colonne.

Elle est utilisée pour obtenir un fractionnement grossier de l'extrait brut. Les séparations sont réalisées en phase inverse sur la silice greffée en C-18 Merck Lobar Lichroprep RP-18 (40-63 µm), ou en phase normale sur une silice Kieselgel Merck (70-230 mesh, 63-200 µm). Le fractionnement est effectué dans un entonnoir cylindrique filtrant sur verre fritté n°4.

#### **II.13.1.4. Chromatographie sur colonne ouverte (CC)**

La chromatographie sur colonne ouverte est une méthode préparative, permettant de séparer les constituants d'un mélange à une pression atmosphérique, dont la masse de la phase stationnaire est égale à 40 fois la masse de l'échantillon.

La taille et le diamètre de la colonne ainsi que le volume des fractions sont choisis en fonction de la quantité d'échantillon à purifier et de la résolution souhaitée.

La séparation est réalisée sur gel de silice KieselgelMerck (dite chromatographie d'adsorption) dont le principe est basé sur la différence d'affinité d'un composé à l'égard de deux phases l'une stationnaire et l'autre mobile. La quantité de la silice est telle qu'elle occupe une hauteur égale à environ 10 fois le diamètre de la colonne.

### **II.13.1.5. Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-ESI-MS/MS)**

La chromatographie liquide, en phase inverse couplée à un spectromètre de masse à ionisation électrospray (LC-ESI-MS/MS), est l'une des techniques d'identification les plus importantes pour la détermination structurale des composés organiques et pour la détection des composés polaires. Cette technique permet d'accéder à la masse moléculaire d'une substance et apporte les informations structurales par le biais de l'étude des fragments moléculaires produits (Verardo *et al.*, 2010).

L'analyse chromatographique des extraits de la plante *E. altissima* a été réalisée sur un système HPLC Waters Alliance (Manchester, U.K) couplée à un spectromètre de masse de type triple quadripôle de marque (ZMD4, Micromass, Waters, Inc., Manchester, U.K.) équipé par l'ionisation électrospray (ESI). La séparation chromatographique est réalisée en phase inverse avec une colonne (Mediterranea Sea18, 5  $\mu$ m, 25  $\times$  4,6 mm ; Teknokroma, Barcelona), thermostatée à 35°C. La phase mobile est constituée de deux solvants eau-acide formique 0,1% (A) et acétonitrile-acide formique 0,1% (B). Le débit a été maintenu à 1 ml/min et le rapport de division est de 5: 1 (UV détecteur MS) pour chaque analyse. Les conditions d'élution appliquées sont : 5–25% B (0–30 min); 25–50% B (30–45 min); 50–100% B (45–47 min); 100–25% B (47–50 min); 25–5% B (50–52); 5% B (52–55 min). La détection a été réalisée à l'aide d'un échantillonneur automatique, une pompe Waters Alliance et un détecteur à barrettes de diodes (Waters 996, Millipore, Manchester, U.K). Le système d'ionisation électrospray-spectromètre de masse (ESI-MS) fonctionne en modes positif et négatif et les paramètres de détection d'ESI-MS sont : l'énergie d'ionisation (70 eV), la tension capillaire (3 kV), la température de dissolution (120 ° C), la température de la source (80 ° C) et la tension d'extraction (12 V).

Afin de tenter l'indentification des composés phénoliques contenus dans les extraits, une série de standards (acide gallique, p-hydroxybenzaldéhyde, acide p-hydroxybenzoïque, acide protocatéchique, acide férulique, acide coumarique, vitexine, isoorientine, vicenine II,

quercétine-3-rhamnoside, K-3-rhamnoside, isovitexine-2-O-rhamnoside and naringénine) a été analysée en parallèle avec les différents extraits d'*E. altissima*. Les solutions mères de chaque standard ont été préparés par dissolution de 10 mg d'étalon analytique dans 10 ml d'éthanol à 80%, toutes les solutions ont été stockées à -20 °C. Des injections en triple ont été faites pour chaque standard et échantillon.

Une solution intermédiaire contenant tous les composés standards (100 µg/ml) a été préparée dans de l'éthanol à 80%. Des dilutions ont été effectuées à partir de cette solution pour établir des courbes d'étalonnage et pour les expériences de validation (effets de matrice, précision et exactitude).

Les composés ont été identifiés en comparant le temps de rétention, les valeurs UV et  $m/z$  obtenues par MS avec celles des standards dans les mêmes conditions. Les courbes d'étalonnage ont été utilisées pour la quantification; les surfaces des pics ont été comparées aux courbes d'étalonnage générées par trois injections répétées de standard connus à sept concentrations (20-100 µg/µl). Les gammes de linéarité pour les courbes d'étalonnage ont été déterminées.

### II.13.2. Méthodes d'identification structurale

L'identification des structures moléculaires organiques se fait généralement par l'utilisation combinée de plusieurs techniques spectroscopiques, la résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone RMN 1D et 2D, la spectrométrie de masse ESI-MS et la spectroscopie UV-Visible.

Ces techniques permettent dans un temps réduit d'avoir des données importantes conduisant à l'élucidation structurale des composés isolés à l'état pur.

#### II.13.2.1. Résonance magnétique nucléaire (RMN)

La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) est une technique d'analyse spectroscopique qui permet d'accéder à la structure des composés chimiques. Elle repose essentiellement sur le phénomène de magnétisme.

Les spectres RMN monodimensionnelles ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) sont réalisés soit sur un spectromètre de type Bruker Avance DRX 500 MHz. Les spectres RMN bidimensionnelles (COSY, HSQC, HMBC, NOESY) sont réalisés sur un appareil de type Bruker Avance DRX 500 MHz. Les échantillons sont dissouts dans des solvants deutériés précisés à chaque fois. Le TMS est utilisé comme substance de référence.

### II.13.2.2. Spectrométrie de masse (MS)

La spectrométrie de masse est une méthode particulièrement sensible et précise quant à l'analyse structurale de molécules et la détermination du pic moléculaire qui donne globalement le nombre et la nature des substituants (hydroxyles ou méthoxyles). Le principe repose sur l'ionisation de l'échantillon. Les ions résultants sont séparés en fonction de leur rapport de masse sur charge ( $m/z$ ).

Ils existent différentes techniques en spectrométrie de masse dont les plus utilisées sont :

- Spectrométrie de masse à impact électronique (EI-MS).
- Spectrométrie de masse à bombardement atomique rapide (FAB).
- Spectrométrie de masse electrospray (ESI-MS).

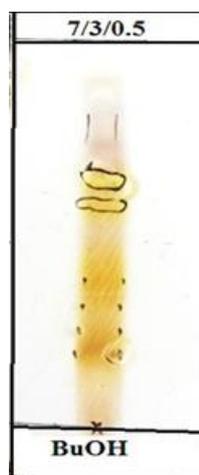
### II.13.2.3. Spectrométrie UV-Visible

La spectrométrie UV-Visible est une technique simple et rapide qui fournit des informations sur la nature chimique, les propriétés physico structurales et les caractéristiques optiques des composés, elle est basée sur l'enregistrement d'un spectre dans un milieu alcoolique (MeOH) sur un spectrophotomètre de type Beckman DU-600 spectrophotometer.

C'est la méthode la plus utilisée pour l'identification des structures flavoniques. Son importance réside dans : l'utilisation des faibles quantités de produit, la facilité d'analyse et l'obtention d'informations sur la position des hydroxyles sur le squelette flavonique.

### II.13.3. Analyse chromatographique des extraits

Après l'examen de chromatographie sur couche mince effectué sur les 3 extraits et le screening phytochimique, notre choix s'est porté sur l'extrait *n*-butanolique. Son profil CCM est présenté dans la figure suivante (**Figure 13**):



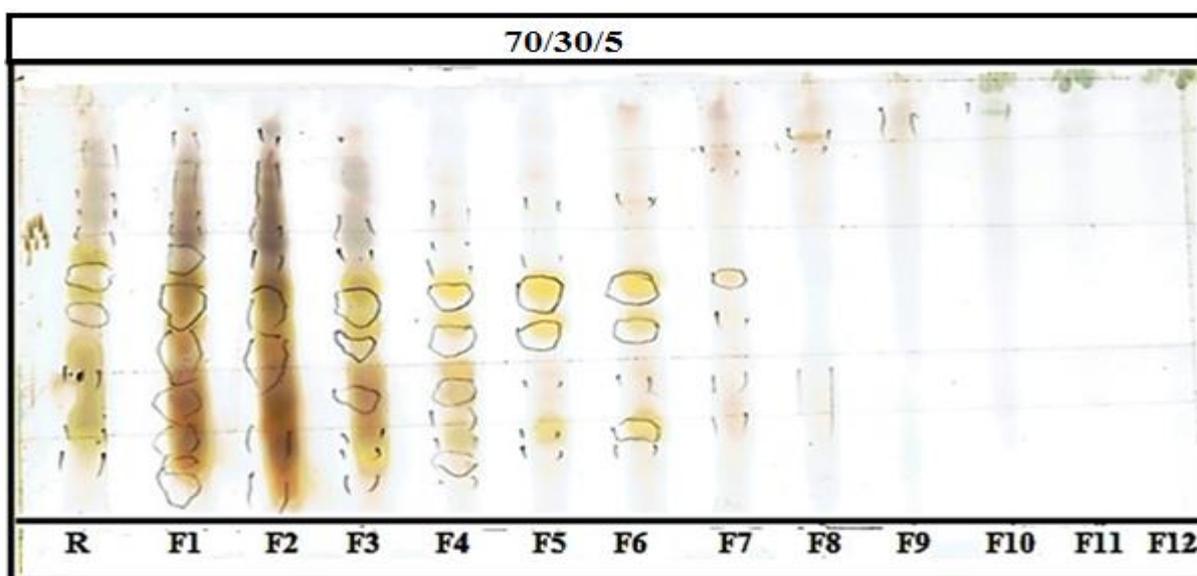
**Figure 13:** CCM de l'extrait *n*-butanolique de la plante *Ephedra altissima*

### II.13.4. Etude de l'extrait *n*-BuOH

5 g de l'extrait *n*-BuOH sont soumis à une chromatographie liquide sous vide (VLC) en utilisant le gel de silice (RP-18) comme phase stationnaire. L'élution est effectuée par le mélange H<sub>2</sub>O/MeOH (80/20 à 0/100), pour donner plusieurs fractions. Ces fractions ont subi une chromatographie sur couche mince (CCM) avec le système d'élution (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O: 7/3/0,5). Les CCM obtenues sont visualisées sous la lumière UV à 254 et 365 nm puis révélées par une solution d'acide sulfurique et chauffage à 100 °C (**Tableau 5 et Figure 14**).

**Tableau 5:** Fractionnement de l'extrait *n*-butanolique.

Fractions collectées	Eluant H <sub>2</sub> O/MeOH	Masse (mg)
F-1	(80/20)	3095
F-2	/	
F-3	60/40	373,3
F-4	/	123,8
F-5	40/60	151,3
F-6	/	144
F-7	20/80	115,8
F-8	/	85,9
F-9	0/100	89,3
F-10	/	80
F-11	/	33,6
F-12	/	30,5



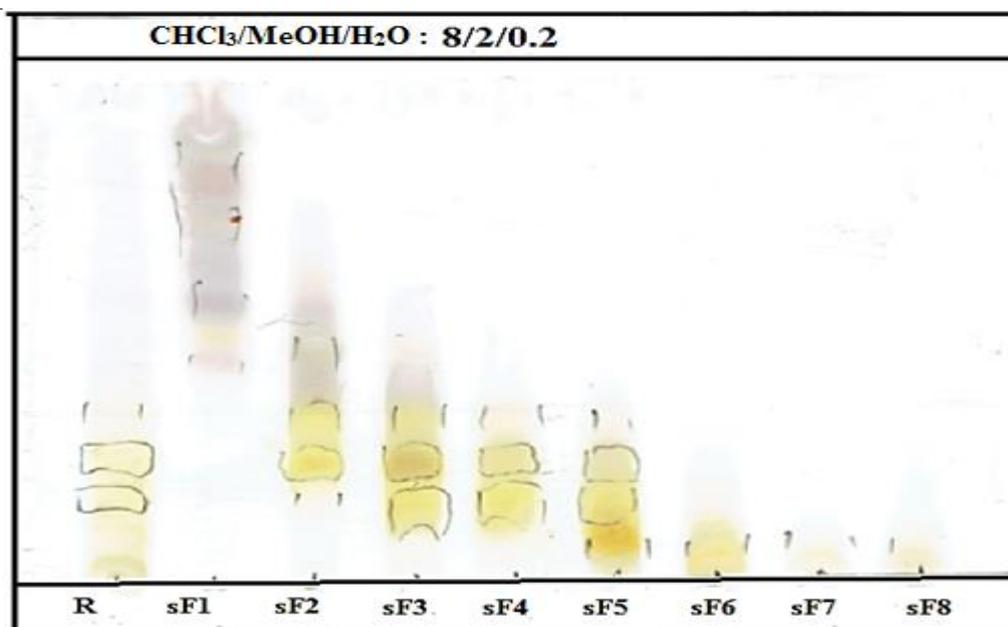
**Figure 14:** CCM récapitulative du fractionnement de l'extrait *n*-butanolique

### II.13.4.1. Etude de la fraction F'-5 (F-5+F-6)

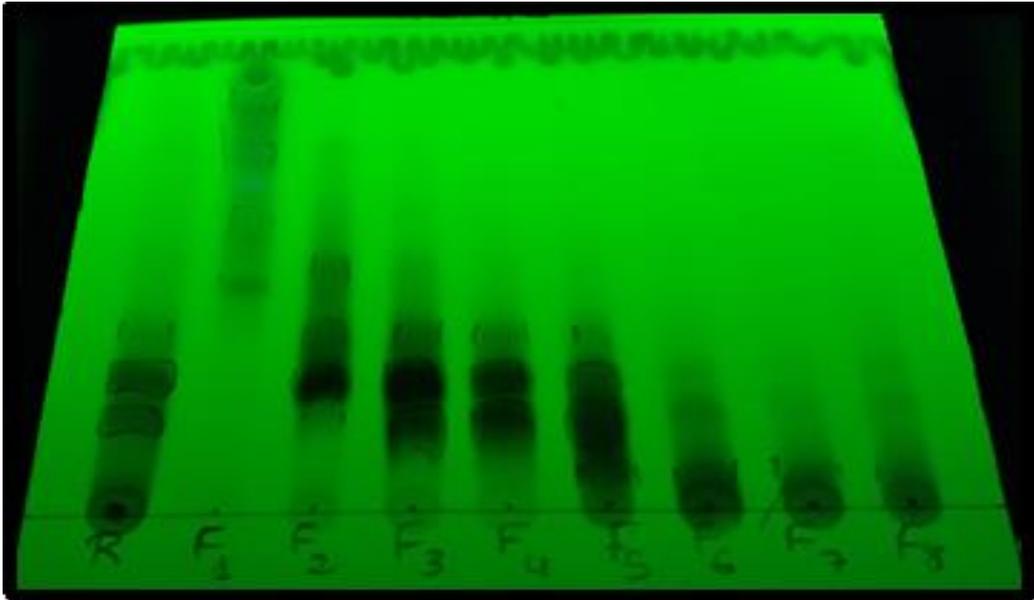
La fraction F'-5 (295,3 mg) est soumise à une chromatographie sur colonne en utilisant la silice normale SiO<sub>2</sub>. L'élution est réalisée par un mélange de CHCl<sub>3</sub>/MeOH (100:0 à 50:50). Les sous fractions collectées sont réunies selon leur profil en CCM en phase normale effectuée dans le mélange (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O : 8/2/0,2 et 7/3/0,5) pour donner 8 sous-fractions sF-1 à sF-8 (**Tableau 6**).

**Tableau 6:** Séparation de la fraction F'-5.

Fractions collectées	Eluant (CHCl <sub>3</sub> /MeOH)	Masse (mg)
sF-1 (1 →25)	0%	16,4
	5%	
	10%	
	15%	
sF-2 (26 → 30)	15%	13,1
sF-3 (31 → 37)	15%	35,3
sF-4 (38 → 43)	15%	18,3
sF-5 (44 → 69)	15%	30,9
	20%	
sF-6 (70 → 75)	20%	23,4
	50%	
sF-7 (76 → 80)	50%	11
sF-8 (81 → 92)	50%	0,45

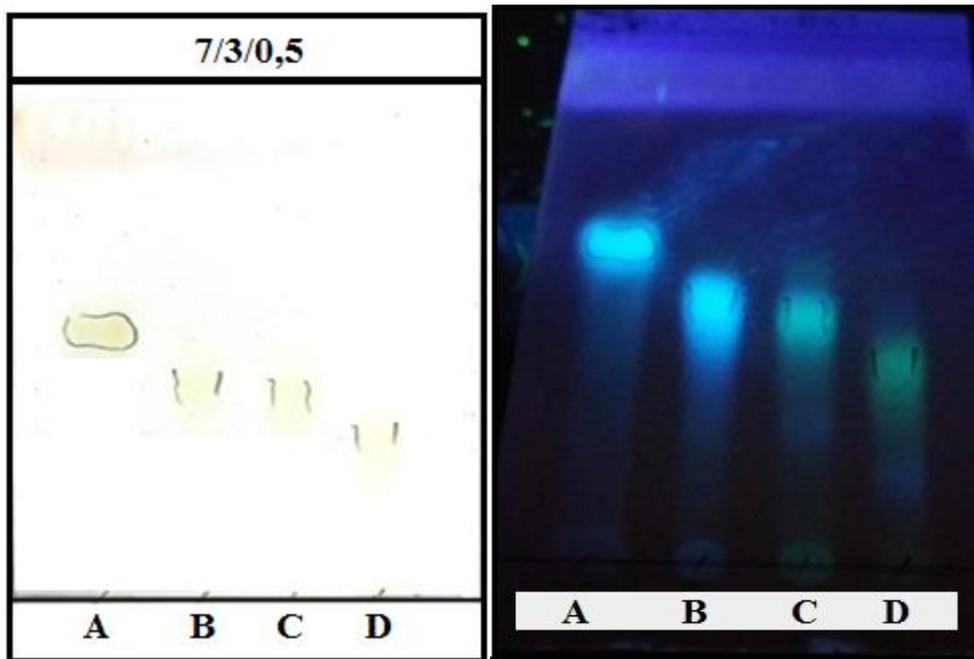


**Figure 15:** CCM récapitulative de la fraction F'-5.



**Figure 16:** CCM récapitulative de la fraction F'-5 révélée sous UV à 254 nm

La sous-fraction sF-5 (30,9 mg) est purifiée sur une plaque préparative en phase normale dans le mélange de solvants  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (7/3/0,5). Cette purification a permis d'obtenir quatre composés A, B, C et D à l'état pur.



**Figure 17:** Profil chromatographique des produits purs (A, B, C et D) sous UV à 365 nm.

# Résultats et discussion

---

### III.1. Extraction et calcul du rendement

Les extraits bruts de la plante *Ephedra altissima* (EP, AcOEt et *n*-BuOH) sont obtenus par une extraction liquide-liquide en utilisant des solvants à polarité croissante.

Ces extraits présentent différents aspects dont l'extrait apolaire éther de pétrole a donné un aspect pâteux (grâce à la présence du chlorophylle, acides gras, lipides et d'autres composés apolaires) avec une couleur vert-noir, alors que l'extrait moyennement polaire (AcOEt) exhibe un aspect solide avec une couleur verdâtre. L'extrait *n*-butanolique est riche en composés polaires avec un aspect visqueux de couleur vert foncée. L'aspect, la couleur et le rendement des extraits obtenus sont reportés dans le **tableau 7**.

**Tableau 7** : Aspect, couleur et rendement des trois extraits d'*Ephedra altissima*

Caractère Extraits	Aspect	Couleur	Quantité de l'extrait en gramme	Rendement (%)
EP	Pâteux	Vert noir	3,24	0,65
AcOEt	Solide	Verdâtre	5,7	1,14
<i>n</i> -BuOH	Visqueux	Vert foncée	10,12	2,02

Le rendement est calculé par apport au poids de la plante.

### III.2. Screening phytochimique

Les tests préliminaires ont indiqué la présence des tanins galliques et catéchiques, les flavonoïdes, les terpénoïdes, les stéroïdes, les coumarines, les saponines et les caroténoïdes, Alors que les alcaloïdes, les quinones et les anthraquinones sont absents (**Tableau 8**).

**Tableau 8**. Mise en évidence de la présence ou l'absence de certaines classes de métabolites secondaires dans l'espèce *E. altissima*.

Métabolites secondaires	Extraits		
	EP	AcOEt	<i>n</i> -BuOH
Flavonoïdes	-	+	+
Tannins	-	-	+
Terpenoides	-	+	-
Stéroïdes	+	-	-
Coumarines	-	-	+
Caroténoïdes	+	-	-
Saponines	-	-	+
Quinones	-	-	-
Anthraquinones	-	-	-
Alcaloïdes	-	-	-

+ = présence des métabolites ; - = Absence des métabolites

Selon les résultats de screening phytochimique l'espèce *E. altissima* est riche en métabolites secondaires, ces résultats sont en accord avec ceux d'Edrah *et al.*, (2016) réalisé sur la même espèce qui pousse en Lybie.

Les analyses phytochimiques préliminaires effectuées sur les espèces *Ephedra alata* et *E. intermedia* ont indiqué la présence de glycosides cardiaques, sucres réducteurs, flavonoïdes, composés phénoliques et alcaloïdes (Jaradat *et al.*, 2016 ; Gul *et al.*, 2017)

L'abondance en principes actifs confère à la plante des propriétés pharmacologiques remarquables (Konkon *et al.*, 2006), ce qui pourrait justifier les multiples indications thérapeutiques de la plante *E. altissima*. En effet, il est nécessaire de confirmer ces résultats par une étude phytochimique approfondie afin d'isoler ces classes de métabolites secondaires.

### III.3. Teneur totale en polyphénols, flavonoïdes et tanins condensés

L'étude quantitative des extraits (EP, AcOEt et *n*-BuOH) issus de l'espèce *E. altissima* par les dosages spectrophotométriques a pour objectif la détermination des teneurs en polyphénols, flavonoïdes et tanins condensés.

Les valeurs ont été calculées à partir des courbes d'étalonnages établis par l'acide gallique, la quercétine et la catéchine (Figures 18, 19 et 20) et elles sont exprimées en microgramme d'équivalent de standard par milligramme d'extrait, respectivement. Les résultats du dosage sont représentés dans le tableau 9.

**Tableau 9** : Résultats des taux de polyphénols, flavonoïdes et tanins condensés des extraits obtenus de la plante *E. altissima*.

	Teneur en polyphénols *	Teneur en flavonoïdes **	Teneur en tanins ***
<b>EP</b>	19,55 ± 1,69 <sup>a</sup>	7,02 ± 0,98 <sup>a</sup>	1,24 ± 0,32 <sup>a</sup>
<b>AcOEt</b>	125,62 ± 1,51 <sup>c</sup>	16,45 ± 0,87 <sup>b</sup>	3,06 ± 0,32 <sup>b</sup>
<b><i>n</i>-BuOH</b>	77,46 ± 0,38 <sup>b</sup>	19,18 ± 0,39 <sup>c</sup>	8,95 ± 1,70 <sup>c</sup>

Les valeurs sont la moyenne de trois essais ± SD. L'analyse statistique est faite par le test *one way* ANOVA suivi par un *post-test* Tukey. Différentes petites lettres dans la colonne indiquent une différence significative ( $p \leq 0,05$ ,  $n = 3$ ). \* µg d'équivalent d'acide gallique par mg d'extrait (µg EAG/mg d'extrait). \*\* µg d'équivalent de quercétine par mg d'extrait (µg EQ/mg d'extrait). \*\*\*µg d'équivalent de catéchine par mg d'extrait (µg EQ/mg d'extrait).

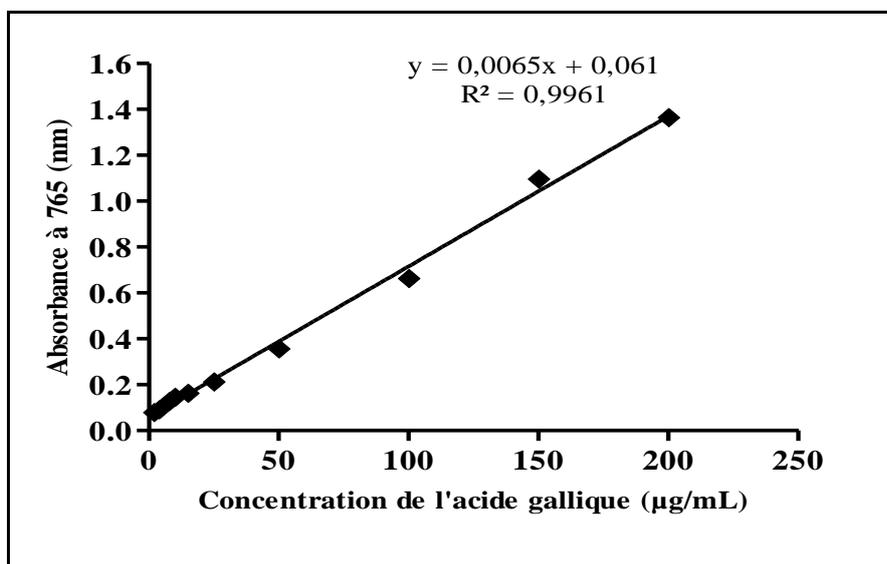


Figure 18 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne ± SD de trois essais).

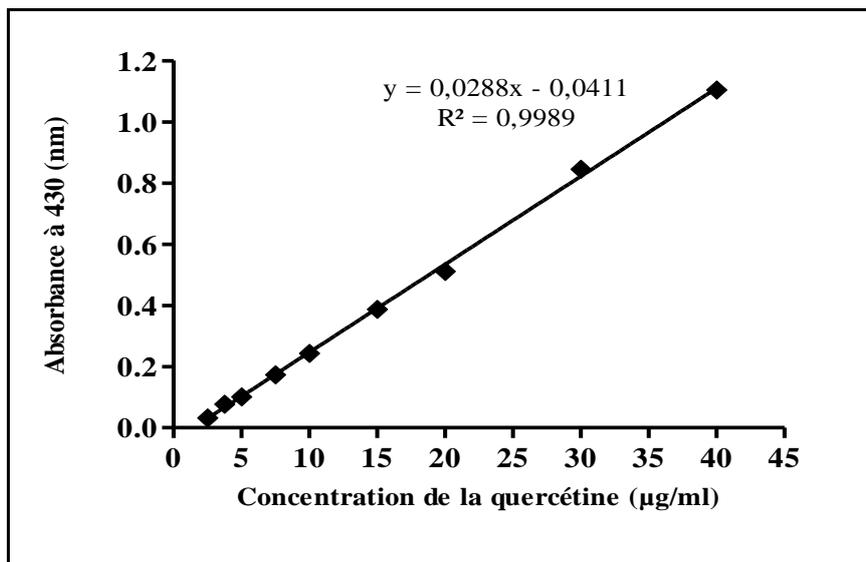


Figure 19: Droite d'étalonnage de la quercétine (moyenne ± SD de trois essais).

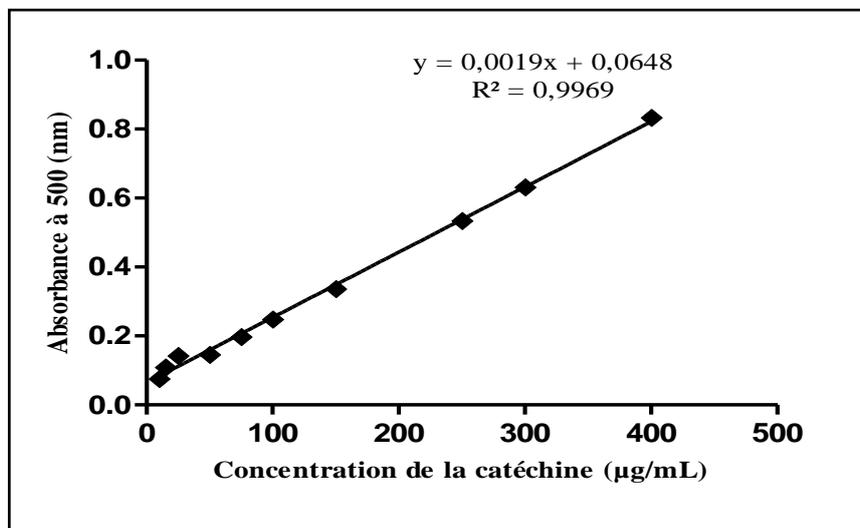


Figure 20: Droite d'étalonnage de la catéchine (moyenne ± SD de trois essais)

Les résultats révèlent que l'extrait AcOEt présentait la plus forte teneur en composés phénoliques (125,62 µg EAG/mg d'extrait), suivi par les extraits *n*-BuOH et EP, respectivement. La plus grande teneur en flavonoïdes et en tanins a été observée dans l'extrait *n*-BuOH avec des valeurs de  $19,18 \pm 0,39$  µg EQ/mg d'extrait et de  $8,95 \pm 1,70$  µg EC/mg d'extrait suivie par les extraits AcOEt et EP, respectivement.

Les analyses de corrélation linéaire ont montré une corrélation positive entre la teneur en composés phénoliques et les flavonoïdes ( $R^2 = 0,77$ ), et entre la teneur en flavonoïdes et les tanins ( $R^2 = 0,82$ ), tandis aucune corrélation n'a été observée entre les composés phénoliques et les tanins.

**Maisuthisakul et al, (2008)** ont constaté que la teneur totale en flavonoïdes dans les extraits éthanoliques de 28 plantes est corrélée à la teneur en composés phénoliques totaux tandis que l'étude réalisée par **Vundać et al, (2007)** a montré l'absence de corrélations entre la teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes de différents extraits de sept espèces du genre *Stachys*. Aussi, **Athamena et al, (2010)** n'ont pas trouvé une corrélation entre les teneurs en polyphénols et flavonoïdes des extraits du *Cuminum cyminum*.

L'étude menée par **Rached et al, (2010)** sur l'extrait aqueux des parties aériennes de la même espèce étudiée *E. altissima* a montré des niveaux faibles en polyphénols par contre des niveaux élevés en flavonoïdes ( $41,27 \pm 2,23$  mg de catéchine/g d'extrait) par rapport à notre résultat. Cependant, l'étude d'**Ibragic et Sofić, (2015)** a montré des taux plus faibles en polyphénols et flavonoïdes pour l'extrait obtenu de la plante *E. altissima* par rapport à la teneur trouvée dans l'espèce poussant en Algérie.

Ainsi, de nombreuses études réalisées sur des espèces du genre *Ephédra* ont montré des variations dans les teneurs en polyphénols et flavonoïdes. En effet, les espèces *Ephedra major*, *E. distachya*, *E. monosperma*, *E. fragilis*, *E. foeminea*, *E. alata*, *E. foliata*, *E. vulgaris*, *E. pachyclada* et *E. sinica* présentent des teneurs plus faibles en polyphénols et flavonoïdes par rapport à l'étude actuelle (**Rached et al., 2010; Ibragic et Sofić, 2015; Alali et al., 2007; Pirbalouti et al., 2013; Song et al., 2010; Harisaranraj et al., 2009**). Tandis que les espèces *E. procera*, *E. sarcocarpa*, *E. strobiliacea*, *E. pachyclada* et *E. laristanica* ont exhibé des teneurs élevées en polyphénols par rapport aux résultats obtenues dans la présente étude (**Dehkordi et al., 2015; Rustaiyan et al., 2011a; Rustaiyan et al., 2011b; Parsaeimehr et al., 2010**).

Cependant, l'analyse quantitative des extraits des espèces *E. intermedia*, *E. przewalskii*, *E. alata*, *E. distachya*, *E. fragilis*, *californica*, *E. fasciculata*, *E. nevadensis*, *E.*

*torreyana*, *E. trifurca* et *E. viridis* a révélé la présence des tannins (Caveney *et al.*, 2001). Selon Harisaranraj *et al.*, (2009), la plante *Ephedra vulgaris* a montré une très faible teneur en tannins ( $0,04 \pm 0,10$  mg / 100 g d'extrait sec) par rapport à la présente étude.

Les variations des teneurs totales en polyphénols, flavonoïdes et tannins peuvent dépendre de plusieurs facteurs tels que: les caractéristiques du sol, la période et la zone de récolte, les conditions de stockage des plantes et la méthode de quantification analytique (Ibragic et Sofić, 2015).

Ces différences pourraient également expliquées par l'absence de spécifié du réactif du Folin-Ciocalteu pour les composés phénoliques qui réagit avec des protéines (tyrosine et tryptophane), des sucres réducteurs, l'acide tartrique, l'acide ascorbique et des composés soufrés (Prior *et al.*, 2005) et par la présence de flavonoïdes (isoflavone et flavanone) non chélatés par  $AlCl_3$  (wang *et al.*, 2008).

Le stress environnemental, la sécheresse et la pauvreté de sol en nutriments ainsi que le fort ensoleillement, peuvent contribuer à l'augmentation du niveau de la production des composés phénoliques dans certaines plantes (Timmermann *et al.*, 1984). Selon Aganga *et al.*, (2001) les facteurs extrinsèques (géographiques et climatiques), les facteurs génétiques, le degré de maturation de la plante et la durée de stockage ont une forte influence sur le contenu en polyphénols. Cela peut expliquer la richesse d'*Ephedra altissima* de notre région en composés phénoliques par rapport aux autres espèces du même genre.

Une répartition hétérogène de ces composés entre les différents solvants d'extraction utilisés a été constatée. Cela, s'expliquerait d'une part, par la diversité structurale des flavonoïdes (Ghedira, 2005) et d'autre part, par le fait que ces composés ne se trouvent pas à l'état libre dans les tissus des végétaux, par conséquent, leur combinaison avec d'autres composés, qu'ils soient polaires ou apolaires peut influencer leur solubilité (Macheix *et al.*, 2005). L'étude menée par Velickovic *et al.*, (2007) sur les extraits de *Salvia officinalis* et *Salvia glutinosa* a montré que les solvants les moins polaires sont utilisés pour l'extraction des flavonoïdes aglycones, alors que les plus polaires sont préconisés pour extraire les flavonoïdes glycosylés.

### III.4. Activité antioxydante

Afin d'évaluer l'activité antioxydante des extraits de plantes, il est préférable d'utiliser différentes méthodes avec différents principes, pour cela l'activité antioxydante des extraits EP, AcOEt et *n*-BuOH des parties aériennes de la plante *Ephedra altissima* a été évaluée par dix méthodes différentes à savoir DPPH, ABTS, FRAP, le pouvoir réducteur, piégeage

du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), l'inhibition de la peroxydation lipidique par la méthode au thiocyanate ferrique (FTC), la capacité antioxydante totale, la capacité antioxydante à réduire le KMnO<sub>4</sub>, test de blanchiment au β-carotène et activité antioxydante par potentiométrie. Les différentes méthodes sont basées sur différents mécanismes d'action, y compris le piégeage des radicaux libres, la capacité réductrice et l'inhibition de la peroxydation lipidique.

#### III.4.1. piégeage des radicaux libres DPPH

Tous les extraits possèdent une activité antioxydante qui varie d'une manière dose-dépendante où l'extrait AcOEt présentait la meilleure capacité de piégeage de DPPH (IC<sub>50</sub> 21,0 µg/ml) suivi des extraits *n*-BuOH et EP avec des valeurs d'IC<sub>50</sub> (94 et 144 µg/ml), respectivement. Les profils de l'activité antioxydante de chaque extrait et standards sont représentés dans la **figure 21** et les résultats sont illustrés dans le **tableau 10**.

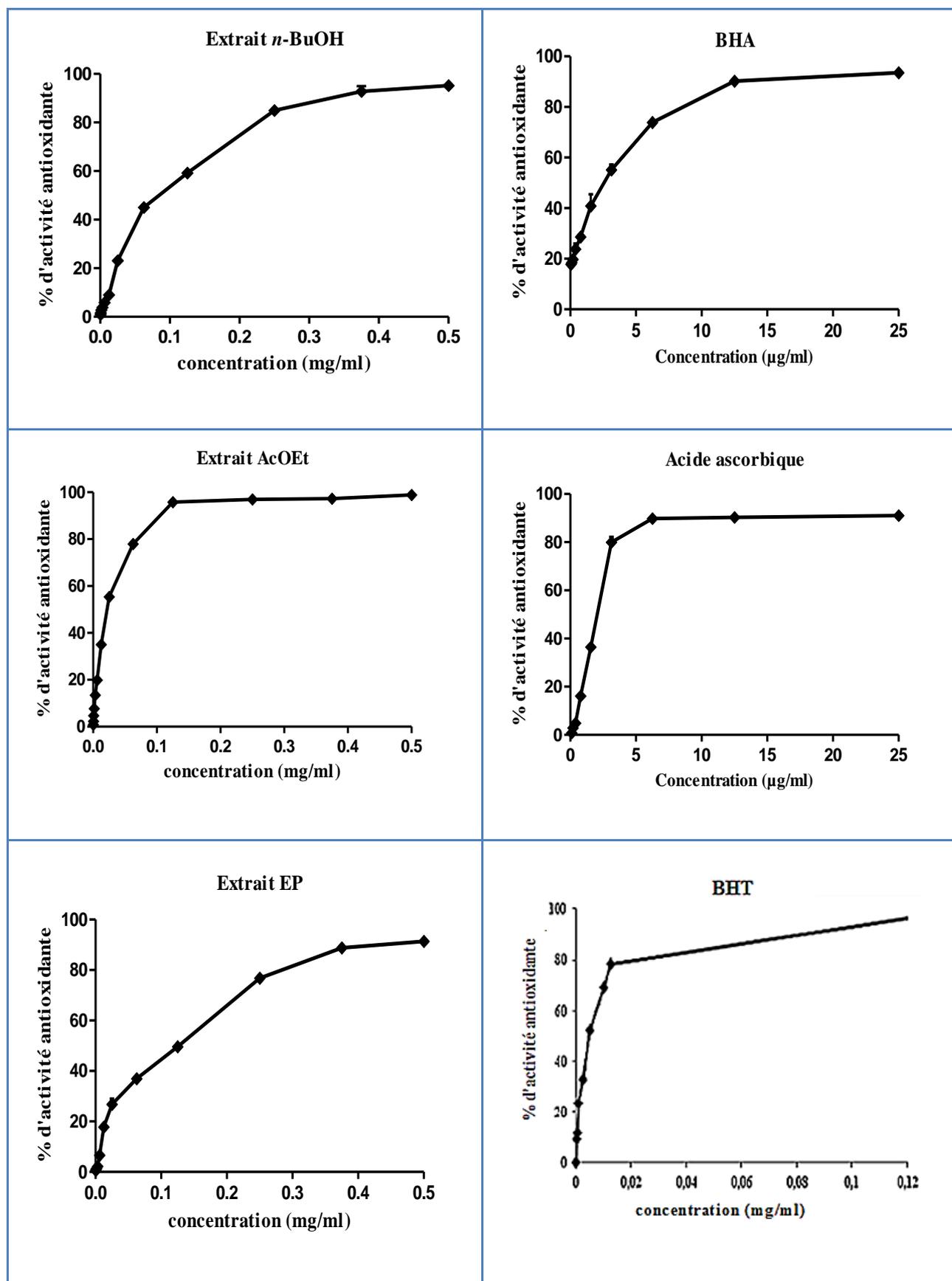
**Tableau 10:** Activité anti-radicalaire des extraits (EP, AcOEt et *n*-BuOH) de la plante *Ephedra altissima*.

Extraits/Standards	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	EC <sub>50</sub> (µg/ml)	APR
<b>EP</b>	144,0 ± 0,008 <sup>d</sup>	6,01 ± 0,34	0,17 ± 0,01
<b>AcOEt</b>	21,0 ± 0,001 <sup>b</sup>	0,89 ± 0,02	1,12 ± 0,03
<b><i>n</i>-BuOH</b>	94,0 ± 0,002 <sup>c</sup>	3,91 ± 0,09	0,26 ± 0,01
<b>BHA</b>	3,13 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,01	8,31 ± 0,88
<b>BHT</b>	3,24 ± 0,26 <sup>a</sup>	0,24 ± 0,26	4,34 ± 0,03
<b>Acide ascorbique</b>	3,15 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,09	7,62 ± 0,06

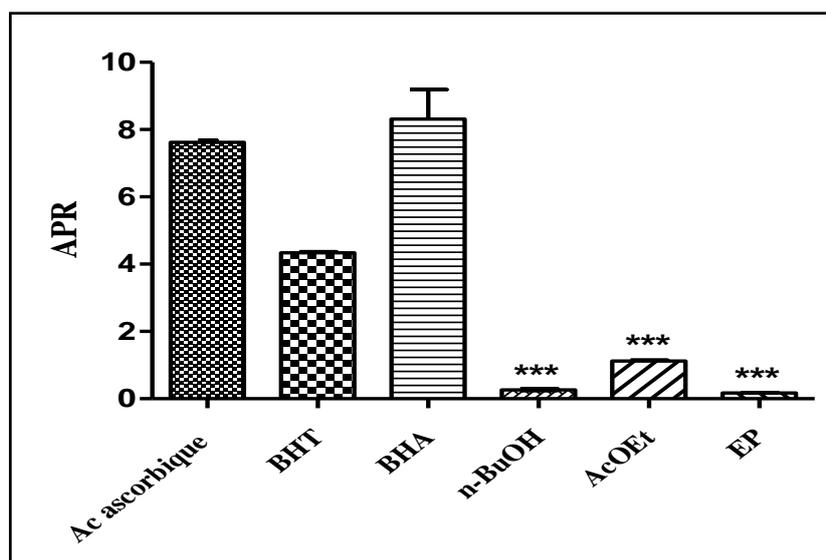
Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ± SD. Différentes petites lettres dans la colonne indiquent une différence significative (p ≤ 0,05, n = 3)

Tous les extraits ont montré une activité anti-radicalaire inférieures à celles des antioxydants standards comme suit: BHT > BHA > acide ascorbique > AcOEt > *n*-BuOH > EP.

Selon l'étude menée par **Rached et al, (2010)**, l'extrait aqueux des parties aériennes de la plante *E. altissima* possède une forte activité du piégeage de radical libre DPPH (IC<sub>50</sub> à 12,01 ± 0,23 µg/ml) par rapport aux résultats de la présente étude.



**Figure 21:** Activité anti-oxydante des extraits (EP, AcOEt et *n*-BuOH) et des standards (BHA, BHT et acide ascorbique) vis-à-vis du radical DPPH en fonction de la concentration (la moyenne de trois essais  $\pm$  SD).



**Figure 22:** Activités anti-oxydantes des extraits et des standards vis-à-vis du radical DPPH (chaque valeur représente la moyenne de trois essais  $\pm$  SD). Les comparaisons sont effectuées entre APR du BHA et APR des différents extraits par le test *one way* ANOVA suivi d'un *post-test* tukey. \*\*\*: Différence très hautement significative,  $p \leq 0,001$ .

Ainsi de nombreuses études sont concentrées sur l'activité antioxydante par DPPH sur des espèces du genre *Ephedra* ont exhibé des différences dans leur potentiel. En effet, les espèces *E. Procera*, *E. pachyclada*, *E. sarcocarpa*, *E. laristanica* et *E. alata* (Ghasemi *et al.*, 2014 ; Dehkordi *et al.*, 2015 ; Rustaiyan *et al.*, 2011a ; Rustaiyan *et al.*, 2011b ; Al-Rimawi *et al.*, 2017; El-Zayat *et al.*, 2021) ont indiqué des valeurs d'IC<sub>50</sub> plus élevées par rapport à celles obtenues dans le présent travail. Tandis que les espèces *E. gerardiana* (Kumar et Singh, 2011 ; Khan *et al.*, 2017) et l'*E. alata* (Jaradat *et al.*, 2015) ont montré des valeurs d'IC<sub>50</sub> faibles par rapport à nos résultats.

L'activité anti-radicalaire des extraits peut être due à la présence des composés antioxydants donateurs d'électrons ou de proton (Wintola et Afolayan, 2015). La détermination des coefficients de corrélation entre les IC<sub>50</sub> et le contenu en composés phénoliques a montré l'existence d'une forte corrélation négative, cette relation inverse fait que les valeurs des IC<sub>50</sub> diminuent avec l'augmentation du contenu de phénoliques. Pour cette raison, l'activité antioxydante des extraits peut être expliquée par la présence de composés phénoliques totaux et des composés flavonoïdiques.

Plusieurs études ont rapporté la relation entre le contenu phénolique et l'activité antioxydante des extraits. En effet, certains auteurs ont trouvé une forte corrélation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante (Kuskoski *et al.*, 2005; Mahattanatawee *et al.*, 2006 ; Thaipong *et al.*, 2006 ; Silva *et al.*, 2007 ; Reddy *et al.*,

2010), tandis que, d'autres études n'ont montré aucune relation entre ces paramètres (Imeh et Khokhar, 2002; Ismail *et al.*, 2004).

Les composés phénoliques sont connus par leur potentiel de piégeage des radicaux libres en raison de la présence des groupements hydroxyles. En conséquences, l'activité antioxydante d'un composé est proportionnelle aux nombres d'hydroxyles et leur position (Simić *et al.*, 2007). Aussi, l'activité antioxydante des composés phénoliques est principalement due à leurs propriétés rédox, qui leur permettent d'agir comme agents réducteurs, donneurs d'hydrogène et chélateurs de métaux (Marimuthu *et al.*, 2008).

Selon Vangalapati et ses collaborateurs, (2014), plusieurs composés phénoliques tels que les flavonoïdes, les tanins, les coumarines et les procyanidines présentent une activité anti-radicalaire dose-dépendante. Les caroténoïdes sont utilisés comme des agents antioxydants supplémentaires et les terpénoïdes jouent également un rôle important dans la défense contre les radicaux libres (Govindarajan *et al.*, 2005). En plus, plusieurs acides phénoliques et flavonoïdes isolés des extraits de la plante *Ephedra altissima* présentent des activités antioxydantes ; acide gallique (Malinda *et al.*, 2017), acide coumarique (Kiliç et Yeşiloğlu, 2017), acide férulique (Zduńska *et al.*, 2018), acide p-hydroxybenzoïque, acide protocatéchique (Chandrasekar *et al.*, 2016), apigénine, lutéoline et quercétine (Romanová *et al.*, 2001). En effet l'activité antioxydante des extraits obtenus de l'espèce *E. altissima* peut être associée à la présence de ces composés.

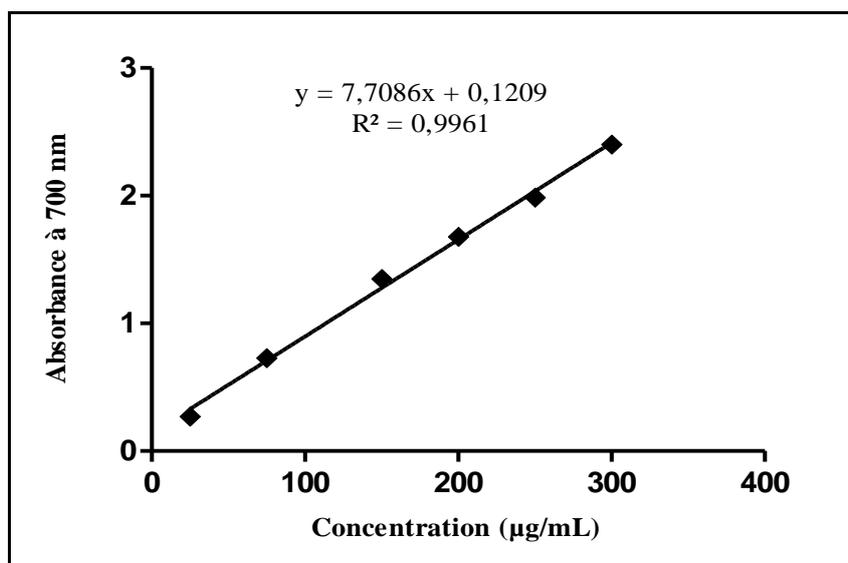
La différence dans l'activité de piégeage des radicaux du DPPH indique que le solvant d'extraction affecterait la présence de métabolites secondaires dans l'extrait, puis le pouvoir de piégeage des radicaux (Kadhun *et al.*, 2011). Le fait que l'activité antioxydante des extraits ayant une forte relation avec le solvant utilisé est principalement due au fait que les composés possédant un potentiel antioxydant se dissolvent différemment dans des solvants de polarités différentes (Boeing *et al.*, 2014).

### III.4.2. Pouvoir réducteur du fer (FRAP)

Le pouvoir réducteur mesure la capacité que possède un antioxydant à donner un électron. Il peut servir comme indicateur du potentiel de l'activité antioxydante (Balasundram *et al.*, 2005).

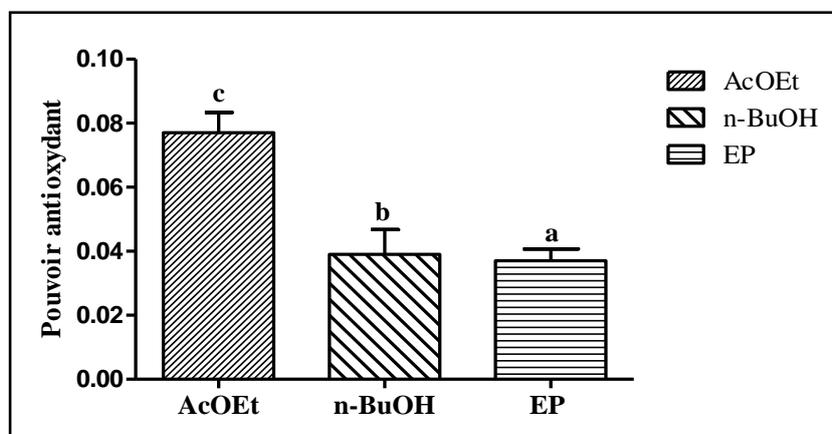
Le pouvoir réducteur des extraits de la plante *E. altissima* est évalué par la méthode de FRAP. Elle est basée sur la capacité des extraits à réduire le fer ferrique  $Fe^{3+}$  en fer ferreux  $Fe^{2+}$  (Chen *et al.*, 2010). Le pouvoir réducteur est calculé à partir de l'équation de régression

de la droite établie par l'acide ascorbique (**Figure 23**). Les valeurs obtenues sont exprimées en microgramme d'équivalent d'acide ascorbique par milligramme d'extrait et les résultats sont illustrés graphiquement dans la **figure 24**.



**Figure 23 :** Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique pour le test FRAP (moyenne  $\pm$  SD)

Les résultats de l'activité antioxydante par réduction de fer indiquent que l'extrait AcOEt possède le pouvoir antioxydant le plus important avec une valeur de  $0,077 \pm 0,64 \mu\text{g}$  EAA/mg d'extrait suivi par les extraits *n*-BuOH et EP avec des pouvoirs réducteurs de l'ordre de  $0,039 \pm 0,78$  et  $0,037 \pm 0,37 \mu\text{g}$  EAA/mg d'extrait, respectivement. Les pouvoirs réducteurs des différents extraits et standard ont été affectés d'une manière dose-dépendante. Les résultats obtenus montrent que tous les extraits ont une capacité de réduire les ions  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$  et la concentration des ions ferreux est proportionnelle à la capacité des extraits de donner des électrons (**Chen et al., 2010**).



**Figure 24:** Pouvoir antioxydant des différents extraits (EP, AcOEt et *n*-BuOH) d'*E. altissima* selon le test FRAP classé par ordre décroissant (moyenne  $\pm$  SD)

Plusieurs études antérieures réalisées sur les plantes du genre *Ephedra* ; *E. sarcocarpa* (Rustaiyan *et al.*, 2011a), *E. laristanica* (Rustaiyan *et al.*, 2011b), *E. strobiliacea*, *E. procera*, *E. pachyclada* (Parsaeimehr *et al.*, 2010) et *E. sinica* (Song *et al.*, 2010) ont exhibé des différences dans leur capacité de réduction de fer. La variation au niveau des résultats obtenus entre les différentes espèces d'*Ephedra* peut être expliquée par la différence du protocole suivi et les standards utilisés en équivalence et les conditions d'extraction. Ainsi, l'activité antioxydante ne dépend seulement de la concentration, mais également de la structure et la nature des antioxydants (Falleh *et al.*, 2008).

La forte corrélation positive observée entre les valeurs du pouvoir antioxydant obtenu par le test FRAP et la teneur en polyphénols totaux ( $R^2 = 0,99$ ), suggère que les composés phénoliques de la plante *E. altissima* ont contribué comme des agents antioxydants donateurs d'électrons.

La différence entre les résultats du pouvoir antioxydant des trois extraits peut être due à la différence de quantité en polyphénols. Certaines études (Othman *et al.*, 2007; Lamien-Meda *et al.*, 2008) ont montré que le pouvoir antioxydant (valeur FRAP) des extraits de plantes est fortement corrélé à leur teneur en polyphénols. Heim *et al.*, (2002) ont rapporté que l'activité antioxydante est également corrélée positivement avec la structure des polyphénols. Généralement, les polyphénols avec un nombre élevé de groupements hydroxyles présentent l'activité antioxydante la plus élevée, due à leur pouvoir à donner des électrons pour stabiliser les radicaux libres (Torres De Pinedo *et al.*, 2007).

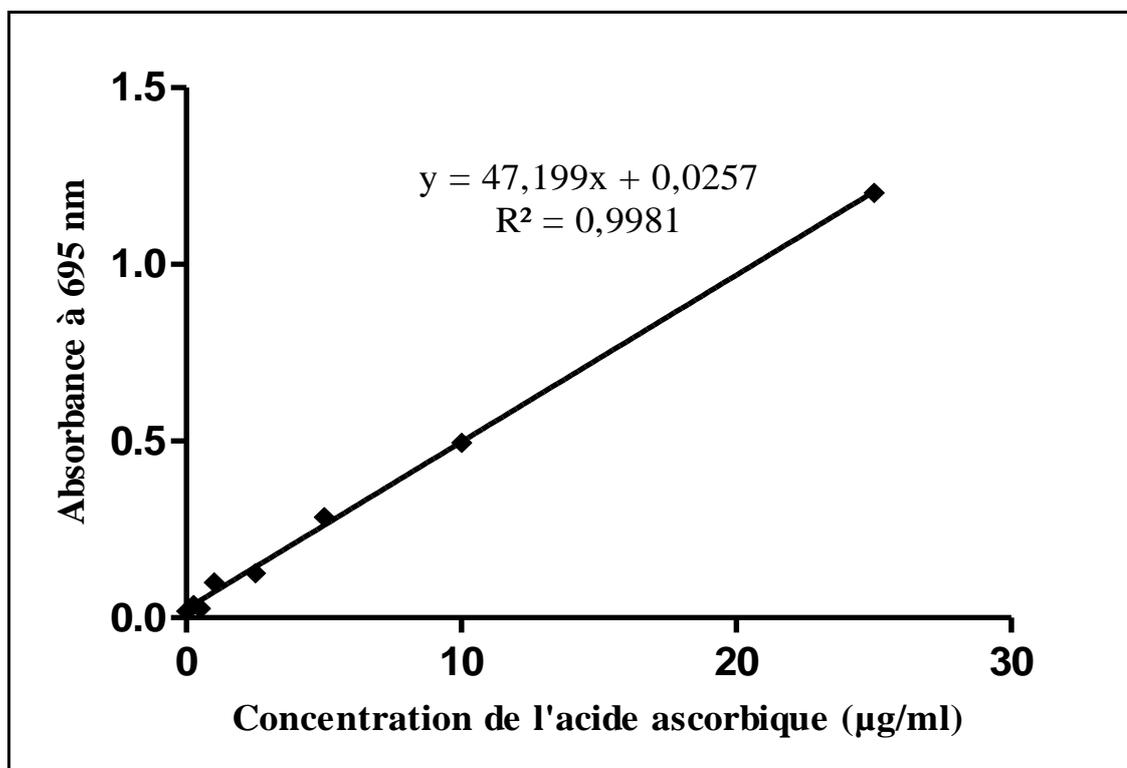
Il est important de noter que l'analyse par le test de Pearson a montré une forte relation de corrélation négative entre les résultats fournis par les différents extraits par les deux tests DPPH et FRAP. Ceci est en accord avec les résultats de Song *et al.*, (2010) sur *Ephedra sinica*, qui ont trouvé aussi cette corrélation entre les capacités antioxydantes mesurées par le test FRAP et le test anti-radicalaire ABTS·+

L'effet antioxydant en piégeant le radical DPPH· est attribué soit à la capacité de libération d'hydrogène ou au transfert d'électrons par les composés antioxydants (Ghasemi *et al.*, 2014; Popovici *et al.*, 2009). La corrélation constatée entre les résultats fournis par les deux tests DPPH· et FRAP pour nos extraits signifie probablement que ces extraits exercent leurs effets antioxydants, en réduisant le DPPH· et le  $Fe^{3+}$  selon le même mécanisme en l'occurrence le transfert d'électrons.

### III.4.3. Capacité antioxydante totale (CAT)

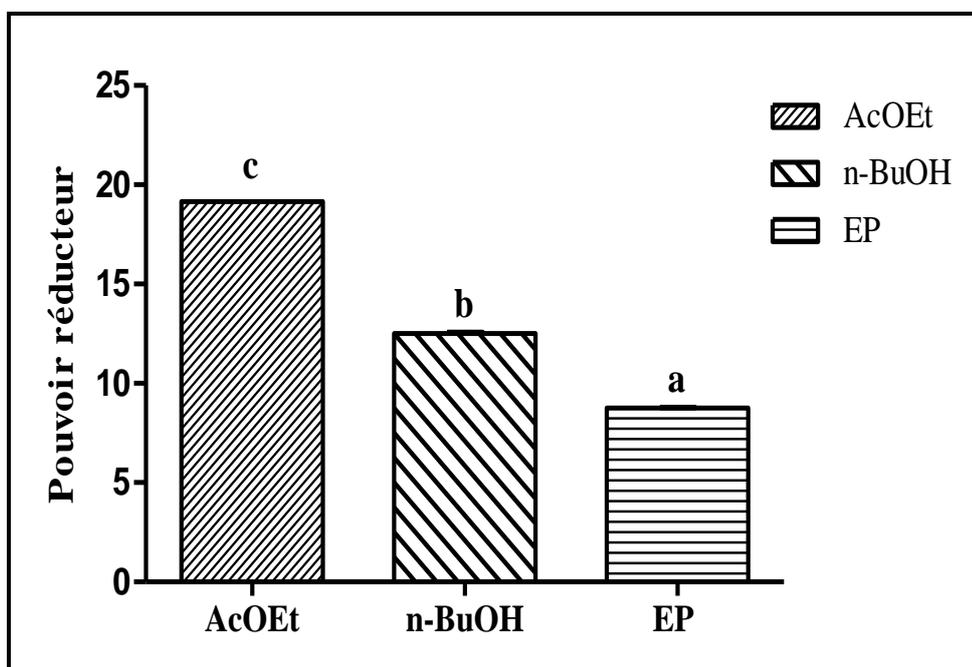
La capacité antioxydante totale des extraits d'*E. altissima* a été déterminée spectrophotométriquement par la méthode de phosphomolybdène basée sur la réduction de Mo (VI) en Mo (V), en présence d'antioxydants (Shumaila *et al.*, 2013).

Le pouvoir réducteur est calculé à partir de l'équation de régression de la droite établie par l'acide ascorbique (Figure 25). Les valeurs obtenues sont exprimées en microgramme d'équivalent d'acide ascorbique par milligramme d'extrait (Figure 26).



**Figure 25 :** Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique pour le test CAT (moyenne  $\pm$  SD)

Les résultats de l'activité antioxydante totale indiquent que l'extrait AcOEt présente le pouvoir antioxydant le plus élevé ( $19,15 \pm 0,002$  µg EAA/mg d'extrait) suivi par l'extrait *n*-BuOH ( $12,52 \pm 0,05$  µg EAA/mg d'extrait), tandis que l'extrait EP est le moins actif ( $8,76 \pm 0,03$  µg EAA/mg d'extrait). Tous les extraits (EP, AcOEt et *n*-BuOH) ont montré une augmentation de la capacité antioxydante par rapport à l'augmentation de la concentration.



**Figure 26:** Pouvoir antioxydant des différents extraits (EP, AcOEt et *n*-BuOH) d'*E. altissima* selon le test CAT classé par ordre décroissant (moyenne ± SD)

Une forte corrélation positive a été trouvée entre les valeurs du pouvoir antioxydant obtenu par le test CAT et la teneur en polyphénols totaux ( $R^2 = 0,98$ ). Plusieurs études en accord avec ces résultats (**Jan et al., 2013 ; Saeed et al., 2012; Hanchinalmath et Londonkar, 2014**), ce qui suggère l'implication des composés phénoliques dans cette activité antioxydante. Le test du phosphomolybdate mesure la capacité d'un extrait à neutraliser un radical libre en transférant un électron à ce dernier. **Khan et al., (2012)** a montré que nombreux flavonoïdes et polyphénols contribuent de manière significative à l'activité de réduction du molybdate des plantes médicinales.

#### III.4.4. Capacité antioxydante par réduction de permanganate

Permanganate de potassium est un réactif redox-actif, largement employé en chimie analytique pour les titrages d'oxydo-réduction. Ce réactif est utilisé pour évaluer la capacité antioxydante totale des extraits bruts ou des produits synthétiques. L'ion  $MnO_4^-$  a été observé comme étant un pro-oxydant dans le milieu alcalin, il est relativement non toxique et pourrait être mesuré spectrophotométriquement. La décoloration de la solution de permanganate indique une augmentation du pouvoir réducteur des antioxydants (**Phatak et Hendre, 2014**).

L'activité de piégeage de permanganate de potassium des différents extraits a été exprimée sous forme d' $IC_{50}$  et comparée avec l'acide ascorbique et le BHA comme standards (**Tableau 11**). Les résultats de l'activité antioxydante ont montré que tous les extraits testés

possèdent une capacité à piéger le permanganate de potassium qui varie d'une manière dose-dépendante où l'extrait AcOEt présentait la meilleure capacité de piégeage de  $\text{KMnO}_4$  ( $\text{IC}_{50}$  204,72  $\mu\text{g/ml}$ ) suivi des extraits *n*-BuOH et EP avec des valeurs d' $\text{IC}_{50}$  (327,47 et 430,08  $\mu\text{g/ml}$ ), respectivement.

**Tableau 11** : Activité antioxydante des extraits (EP, AcOEt et *n*-BuOH) d'*E. altissima* et des standards par la méthode de piégeage de permanganate de potassium.

<b>Extraits/Standards</b>	<b><math>\text{IC}_{50}</math> (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
<b>EP</b>	430,08 $\pm$ 0,27 <sup>e</sup>
<b>AcOEt</b>	204,72 $\pm$ 0,32 <sup>c</sup>
<b><i>n</i>-BuOH</b>	327,47 $\pm$ 0,24 <sup>d</sup>
<b>BHA</b>	193,17 $\pm$ 0,56 <sup>b</sup>
<b>Acide ascorbique</b>	23,44 $\pm$ 1,16 <sup>a</sup>

Chaque valeur représente la moyenne de trois essais  $\pm$  SD. Différentes petites lettres dans la colonne indiquent une différence significative ( $p \leq 0,05$   $n = 3$ ).

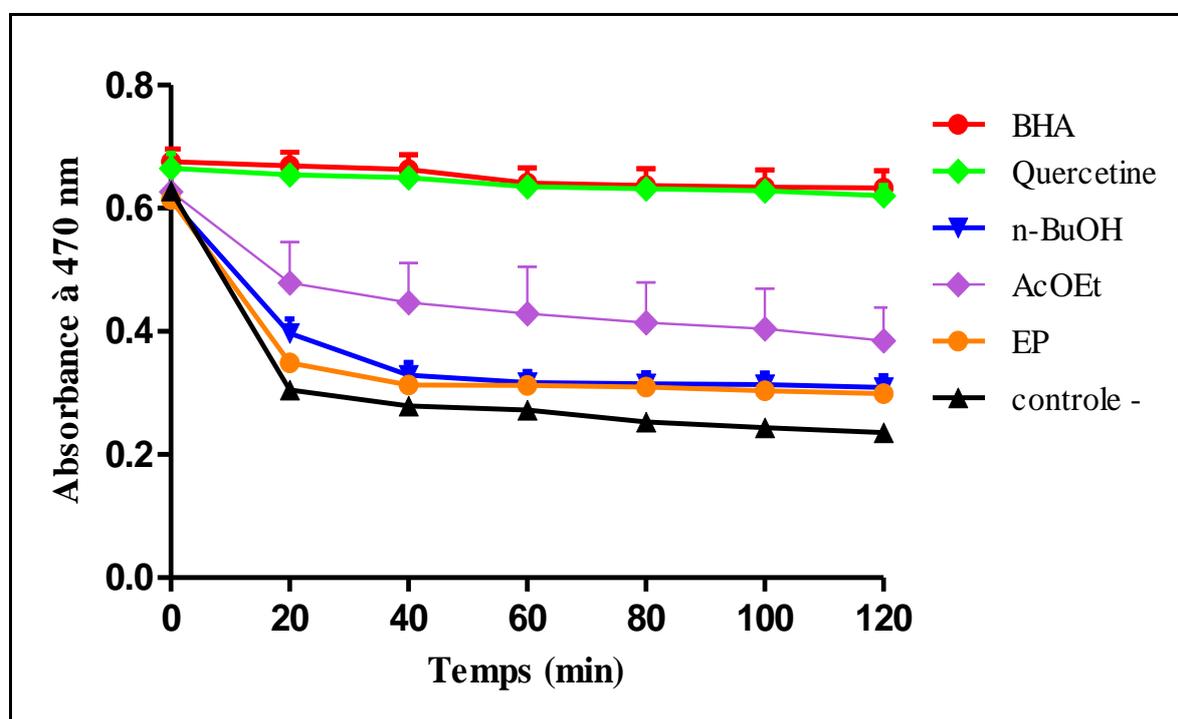
L'analyse des coefficients de corrélation a montré l'existence d'une forte corrélation négative entre les valeurs  $\text{IC}_{50}$  et le contenu en polyphénols et flavonoïdes, mais aucune corrélation n'a été constatée avec la teneur en tanins. Par conséquent, la capacité des extraits de piéger le permanganate de potassium peut être expliquée par la présence de composés phénoliques totaux et des flavonoïdes. Les composés phénoliques sont connus pour leur potentiel de piégeage des radicaux libres en raison de la présence de groupes hydroxyles (Simić *et al.*, 2007). Les mécanismes de réaction d'oxydation des phénols, dans les solutions alcalines sont mieux compris, mais ils sont plus complexes dans les solutions acides (Coplovici et Baldea, 2007).

#### **III.4.5. Test de blanchissement du $\beta$ -carotène**

La peroxydation lipidique, induite par les radicaux libres, est considérée comme étant le mécanisme majeur de la destruction membranaire et du dommage cellulaire. Le test de blanchissement du  $\beta$  carotène a été élaboré dans le but de mesurer l'aptitude des extraits de plantes à inhiber la peroxydation lipidique.

La capacité antioxydante des extraits est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative du  $\beta$  carotène par les produits d'oxydation de l'acide linoléique. Les radicaux libres de l'acide linoléique formés lors de la production d'un atome d'hydrogène à partir de l'un de ses groupes méthylène diallyliques, ces radicaux libres attaquent le  $\beta$ -carotène hautement insaturée. En conséquence, le  $\beta$ -carotène est oxydé et décomposé en partie; ensuite il perd sa caractéristique de couleur orange, qui est mesurée par spectrophotométrie à 470 nm (Rufino *et al.*, 2010).

Les antioxydants transfèrent des atomes d'hydrogène aux peroxydes formés au cours de l'oxydation de l'acide linoléique et les convertit en hydroperoxydes laissant les molécules de  $\beta$ -carotène intactes et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du  $\beta$ -carotène (Liu *et al.*, 2010). La cinétique de blanchissement de  $\beta$ -carotène en absence et en présence des extraits, et des antioxydants standards (BHA et quercetine) est représentée dans la **figure 27** et le **tableau 12**.



**Figure 27.** Cinétique de blanchissement du  $\beta$ -carotène en présence des extraits (EP, AcOEt et *n*-BuOH) d'*E. altissima* et des standards (la moyenne  $\pm$  SD).

D'après ces résultats, les extraits testés inhibent d'une manière hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du  $\beta$ -carotène par rapport au contrôle négatif qui représente presque 98 % de la peroxydation. En effet, l'extrait AcOEt présente le plus grand effet inhibiteur vis-à-vis de la peroxydation lipidique avec une AAR estimé à 58,30% suivi par les extraits *n*-BuOH et EP avec des AAR de l'ordre de 32,28 et 23,83%

respectivement. Cette activité reste significativement inférieure ( $P \leq 0,001$ ) à celle des contrôles positifs (BHT et la quercétine) qui montrent une forte activité antioxydante avec des valeurs d'AAR de 93,26 et 92,96%, respectivement (**Figure 28**)

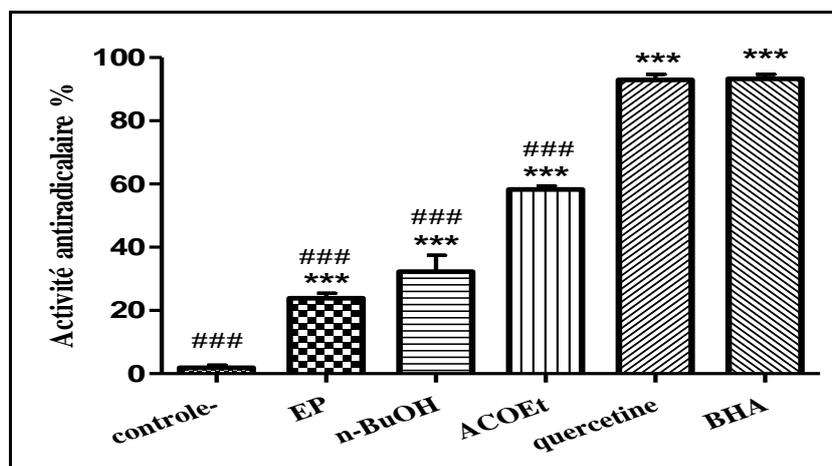
**Tableau 12:** Activité antiradicalaire des extraits (EP, AcOEt et *n*-BuOH) d'*E. altissima* et des standards par la méthode de blanchissement du  $\beta$ -carotène.

<b>Extraits et contrôle</b>	<b>AAR%</b>
<b>EP</b>	23,83±1,63 <sup>a</sup>
<b>AcOEt</b>	58,30±1,10 <sup>c</sup>
<b><i>n</i>-BuOH</b>	32,28±5,21 <sup>b</sup>
<b>BHA</b>	93,26±1,46 <sup>d</sup>
<b>Quercétine</b>	92,96±1,75 <sup>d</sup>
<b>Control -</b>	1,85±0,88

Les valeurs représentent la moyenne de trois essais  $\pm$  SD. L'analyse statistique est faite par le test *one way* ANOVA suivi par un *post-test* Tukey. Différentes petites lettres dans la colonne indiquent une différence significative ( $p \leq 0,05$ ,  $n = 3$ )

Selon **Liyana-Pathriana et Shahidi, (2006)** un extrait qui inhibe ou retarde le blanchissement du  $\beta$  carotène peut être décrit comme un piègeur de radicaux libres et comme un antioxydant primaire. Le test d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique couplée à celle du  $\beta$ -carotène, paraît très utile comme un modèle mimétique de la peroxydation des lipides dans les membranes biologiques (**Ferreria et al., 2006**).

L'étude menée par **Rached et ses collaborateurs, (2010)** a montré un test positif lors de la détermination de l'inhibition de l'oxydation du  $\beta$ -carotène par bioautographie de l'extrait aqueux des parties aériennes de la plante *E. altissima*, ce qui en concordance avec les résultats obtenus.



**Figure 28 :** L'activité antiradicalaire des extraits (EP, AcOEt et *n*-BuOH) d'*E. altissima* et des standards. Les valeurs exprimées sont les moyennes  $\pm$  SD de trois mesures. Les données ont été analysées par le *test* ANOVA suivie d'un test post-hoc Tukey. Les comparaisons sont effectuées par rapport au contrôle négatif (\*\*\*)  $P \leq 0,001$  et par rapport au contrôle positif (###)  $P \leq 0,001$

Une forte corrélation positive ( $R^2 = 0,94$ ) a été observée entre les valeurs d'ARR et les teneurs en polyphénols des différents extraits. Il a été démontré que les polyphénols jouent un rôle important dans la stabilisation de la peroxydation lipidique (El Hage *et al.*, 2012 ; Hussin *et al.*, 2014). En effet, ils réagissent le plus souvent avec les radicaux peroxydes ( $LOO\cdot$ ) ou alcoxydes ( $LO\cdot$ ), interrompant ainsi la réaction de propagation de la peroxydation en cédant un hydrogène à ces radicaux. Ces antioxydants sont principalement des composés phénoliques mono- ou poly-hydroxylés (Cillard et Cillard, 2006).

L'activité antioxydante de l'extrait AcOEt est statistiquement supérieure à celle de l'extrait *n*-BuOH ( $p \leq 0,001$ ), il existe probablement des différences qualitatives dans la nature des composés phénoliques qui entrent dans la composition des extraits, influençant leur pouvoir antioxydant. Les flavonoïdes glycosylés (*n*-BuOH) ont une activité antioxydante inférieure à celle des flavonoïdes non glycosylés (AcOEt). Comme exemple la rutine est presque dix fois moins active que la quercetine qui est déjà identifiée dans l'extrait AcOEt (Sokol-Letowska *et al.*, 2007)

L'extrait EP renferme la teneur la plus faible en polyphénols, et flavonoïdes, mais il possède une activité significative ( $P \leq 0,001$ ) en comparaison avec le control négatif, ceci pourrait être due à la contribution des huiles essentielles ainsi qu'à d'autres composés apolaires. L'effet antioxydant des composés apolaires (acide gras et/ou phospholipides) pourrait être le résultat d'une action synergique (Klervi, 2005).

Ainsi, la mesure du contenu en polyphénols indique la teneur en composés lipophiles et hydrophiles (Miraliakbari *et al.*, 2008). Selon Frankel et Meyer, (2000), le test de blanchissement du  $\beta$  carotène est similaire à un système d'émulsion de lipides dans l'eau, ces deux auteurs ont proposé que les antioxydants apolaires présentent des propriétés antioxydantes car ils sont concentrés au sein de l'interface lipide-eau, permettant ainsi la prévention de la formation des radicaux lipidiques et l'oxydation du  $\beta$  carotène. Alors que les antioxydants polaires restent dilués dans la phase aqueuse et sont ainsi moins efficaces dans la protection des lipides.

#### III.4.6. Inhibition de la peroxydation lipidique par la méthode au thio-cyanate ferrique (FTC)

L'activité antioxydante des extraits d'*E.altissima* est évaluée par l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique en utilisant la méthode au thiocyanate ferrique qui a été employée pour estimer le niveau de peroxyde au cours de la phase initiale d'oxydation lipidique, en mesurant la quantité de  $Fe^{2+}$  oxydée en  $Fe^{3+}$  par les peroxydes lipidiques. Par conséquent, le complexe thiocyanate- $Fe^{3+}$  produit a une couleur rouge foncé qui est détectable à 500 nm (Liu et Yao, 2007). Les faibles valeurs d'absorbance indiqueraient des niveaux élevés d'activité antioxydante.

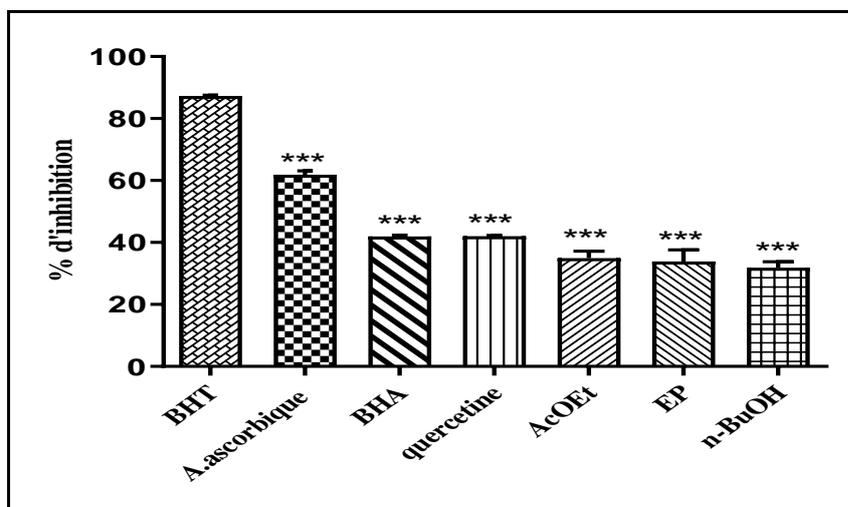
L'activité antioxydante totale des extraits a été exprimée sous forme de pourcentage d'inhibition à la fin de sept jours et comparée avec l'acide ascorbique, BHA, BHT et quercétine comme standards (Tableau 13).

**Tableau 13 :** L'activité antioxydante total de différents extraits (EP, AcOEt et *n*-BuOH) d'*E. altissima* et des standards par la méthode de FTC.

Extraits et contrôle	Activité antioxydante (% d'inhibition)
<i>n</i> -BuOH	31,88 ± 1,90 <sup>a</sup>
AcOEt	34,93 ± 2,31 <sup>a</sup>
EP	33,92 ± 3,71 <sup>a</sup>
Acide ascorbique	61,86 ± 1,26 <sup>c</sup>
BHT	87,31 ± 0,27 <sup>d</sup>
BHA	41,92 ± 0,44 <sup>b</sup>
Quercetine	42,07 ± 0,25 <sup>b</sup>

Les valeurs représentent la moyenne de trois essais ± SD. L'analyse statistique est faite par le test *one way* ANOVA suivi par un *post-test* Tukey. Différentes petites lettres dans la colonne indiquent une différence significative ( $p \leq 0,05$ ,  $n = 3$ ).

Les résultats obtenus ont révélé que tous les extraits (EP, AcOEt et *n*-BuOH) ont un potentiel antioxydant modéré dans l'inhibition de la peroxydation lipidique avec des valeurs de 33,92, 34,93 et 31,88 % respectivement. Les données sont illustrées graphiquement dans la **figure 29**.



**Figure 29:** L'activité antioxydante totale de différents extraits (EP, AcOEt et *n*-BuOH) d'*E. altissima* et des standards par la méthode de FTC classés par ordre décroissant. Les données sont exprimées par moyenne  $\pm$  SD ( $n=3$ ). L'analyse statistique a été réalisée par le test *one way* ANOVA suivi d'un *post-test* tukey. Les comparaisons sont faites avec BHT (le standard le plus actif). \*\*\*  $P \leq 0,001$ .

La détermination de coefficient de corrélation entre l'activité antioxydante totale mesurée par la méthode FTC et la teneur en polyphénols totale des extraits a montré l'existence d'une forte corrélation positive ( $R^2 = 0,99$ ) qui est en accord avec les résultats de **Shahwar et Raza, (2012)**, ce qui suggère que cette activité pourrait être attribuée à la présence des composés phénoliques dans les différents extraits.

Les composés phénoliques peuvent donner de l'hydrogène et peuvent terminer la chaîne de réaction des radicaux libres en la transformant en composés stables (**Amarowicz et al., 2000**). Il existe différents types de composés phytochimiques, notamment les flavonoïdes, les tanins et les coumarines, qui sont efficaces pour prévenir la peroxydation lipidique (**Haraguchi, 2001**).

Dans la méthode FTC, le caractère hydrophobe et la solubilité des antioxydants dans une émulsion d'acide linoléique influent sur le test (**Erkan et al., 2008**). Cela peut expliquer le potentiel antioxydant d'extrait EP dans l'inhibition de la peroxydation lipidique qui est

statistiquement forme un groupe homogène avec les extraits *n*-BuOH et AcOEt malgré la richesse de ces derniers en composés phénoliques par rapport à l'extrait EP.

Le potentiel antioxydant d'une plante ne dépend pas uniquement du contenu phénolique. Certaines études ont indiqué que les terpénoïdes ont une activité plus puissante dans l'inhibition de la peroxydation lipidique (Olatunde *et al.*, 2003 ; Grassmann *et al.*, 2002). L'effet synergique des différents composés présents dans l'extrait d'*E. altissima* pourraient être responsables de leurs activités inhibitrices de la peroxydation lipidique.

#### III.4.7. Piégeage du peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) est non réactif, mais ses concentrations élevées sont toxiques pour les cellules vivantes. Le peroxyde d'hydrogène est naturellement présent à de faibles concentrations dans l'air, l'eau, le corps humain, les plantes, les micro-organismes et les aliments. Il pénètre dans le corps humain par inhalation ou par contact avec la peau. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se décompose rapidement en oxygène et en eau qui peut produire des radicaux hydroxyles (OH<sup>•</sup>) qui peut initier la peroxydation lipidique et causer des dommages de l'ADN (Khan *et al.*, 2012).

L'activité de piégeage de peroxyde d'hydrogène des différents extraits à une concentration de 100 µg/ml a été exprimée sous forme de pourcentage d'inhibition et comparée avec l'acide ascorbique comme standard (tableau 14).

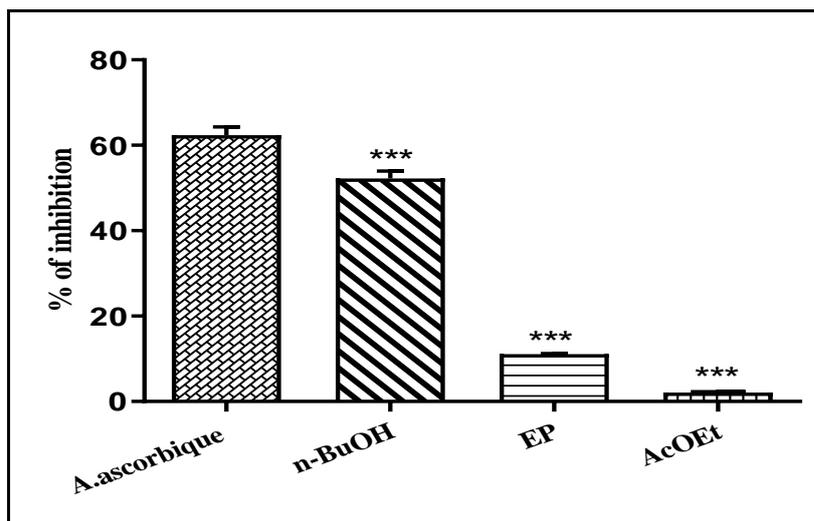
**Tableau 14** : Pouvoir antioxydant des différents extraits d'*E. altissima* selon le test de piégeage du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Extraits et standard	Piégeage du peroxyde d'hydrogène (% d'inhibition)
<i>n</i> -BuOH	52,24 ± 0,67 <sup>c</sup>
AcOEt	2,13 ± 0,50 <sup>a</sup>
EP	11,17 ± 0,67 <sup>b</sup>
Acide ascorbique	62,36 ± 1,26 <sup>d</sup>

Les valeurs représentent la moyenne de trois essais ± SD. L'analyse statistique est faite par le test *one way* ANOVA suivi par un *post-test* Tukey. Différentes petites lettres dans la colonne indiquent une différence significative (p ≤ 0,05, n = 3).

D'après les résultats, l'extrait *n*-BuOH présente l'activité de piégeage de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> la plus élevée avec un pourcentage de (52,24%), suivi de l'extrait EP et AcOEt qui révèlent une activité faible avec des pourcentages de l'ordre de 11,17 et 2,13%, respectivement. Cette activité reste significativement inférieure à celle de l'acide ascorbique utilisé comme standard

qui a montrant une forte activité de piégeage de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec un pourcentage de (62,36%). Les données sont illustrées graphiquement dans la **figure 30**.



**Figure 30:** Pouvoir antioxydant des différents extraits (EP, AcOEt et *n*-BuOH) d'*E. altissima* et du standard selon le test de piégeage du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> classés par ordre décroissant (moyenne ± SD)

Les analyses de corrélation linéaire n'ont montré aucune corrélation entre l'activité de piégeage du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des différents extraits et les teneurs en polyphénols et flavonoïde mais une forte corrélation positive est observée avec les teneurs en tanins ( $R^2 = 0,92$ ). **Vinodhini et al., (2016)** ont rapporté que les plantes médicinales ont la capacité de réduire le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O, si elles contiennent des composés pouvant donner des électrons.

Plusieurs études ont révélé que l'activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène augmente avec la concentration en polyphénols (**Balasundram et al., 2005 ; Gokturk et al., 2007 ; Wang et al., 2008**). Pour cette raison, l'activité de l'extrait *n*-BuOH peut être expliquée par la présence de groupes phénoliques susceptibles de donner des électrons au peroxyde d'hydrogène et par conséquent entraîne leur neutralisation en eau.

L'activité faible présentée par les extraits AcOEt et EP à piéger l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pourraient être expliquée par l'effet antagoniste entre les composants présents dans ces extraits. **Sroka et Cisowski, (2003)** ont rapporté que l'activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène est plus élevée pour l'acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque (acide gallique) déjà identifié dans l'extrait AcOEt et le 1, ,3-trihydroxybenzène. Cependant, une diminution dans l'activité a été observée lorsque les acides 3,4-dihydroxycinnamique, 3,4-dihydroxybenzoïque, 2,5-dihydroxybenzoïque et 3,4-dihydroxyphénylacétique ont été ajoutés au mélange réactionnel et presque aucune activité de piégeage de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'a été observée pour les acides 3-hydroxybenzoïque et 2,4-dihydroxybenzoïque.

Ces résultats peuvent être expliqués aussi par l'efficacité des composés phénoliques présents dans les extraits et qui sont responsables du piégeage de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'efficacité des composés phénoliques en tant qu'anti-radicaux et antioxydants est diverse et dépend de nombreux facteurs, tels que le nombre de groupes hydroxyles liés au cycle aromatique, le site de liaison et la position mutuelle d'hydroxyles dans le cycle aromatique (**Sroka et Cisowski, 2003**).

### III.4.8. Activité antioxydante par potentiométrie

L'activité antioxydante par potentiométrie a été développée pour évaluer rapidement et de manière reproductible la capacité antioxydante caractéristique des extraits aqueux des plantes. Cette technique potentiométrique basée sur les interactions chimiques entre les antioxydants présents dans les extraits bruts et le système médiateur K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]/K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] conduisant à un transfert d'électrons

Les antioxydants réagissent avec la forme oxydée du couple rédox, en modifiant le rapport de concentration entre les formes oxydée et réduite, qui se traduit par un changement dans la valeur du potentiel (**Brainina et al., 2019**).

En fait, un changement du potentiel redox a été corrélé indirectement avec le pouvoir réducteur des anti-oxydants dans l'extrait testé ; les potentiels réduits sont corrélés à des capacités accrues de donation d'électrons et, par conséquent, à des activités antioxydantes élevées (**Kovalchuk et al., 2019**). L'activité antioxydante de l'extrait aqueux de la plante *E. altissima* a été calculée à partir de la loi de Nernst et le résultat est exprimé en mol-eq/l.

Les résultats montrent que l'extrait aqueux préparé à partir de l'espèce *E. altissima* présente une capacité à réduire le fer III en fer II avec une valeur de  $0,68 \pm 0,3$  mol-eq/l, cette activité est probablement due à la présence des composés phénoliques capables de céder un ou plusieurs électrons pour réduire le fer III en fer II (**Zhao et al., 2014**). L'électro-activité peut s'expliquer par la présence de structures ène-diol, de groupes hydroxyle ou sulfhydryle (**Goyal et al., 1982**)

### III.5. Activité anti-arthritique

La dénaturation des protéines est un processus pathologique qui provoque une inflammation. La plupart des protéines perdent leurs fonctions biologiques par l'altération de leurs structures secondaires et tertiaires. Cela se produit généralement lorsque les protéines sont exposées à un stress externe tel que la chaleur, un acide ou une base forte (**Ingle et Patel, 2011**).

Les mécanismes de dénaturation impliquent une altération des liaisons électrostatiques, hydrogènes, hydrophobes et les ponts disulfures (Arya *et al.*, 2014). La dénaturation des protéines *in vivo* se produit en cas de processus inflammatoire auto-immun par la production des auto-antigènes induisant une multitude de maladies, y compris l'arthrite rhumatoïde, le diabète et l'obésité (Sangeetha et Vidhya, 2016).

Les médicaments anti-inflammatoires sont connus pour inhiber la dénaturation des protéines. Par conséquent, les produits qui peuvent empêcher la dénaturation des protéines, seraient donc des candidats possibles pour le développement des médicaments anti-inflammatoire et anti-arthritique (Banerjee *et al.*, 2014).

L'effet anti-inflammatoire des extraits (EP, AcOEt et *n*-BuOH) d'*E. altissima* a été évalué par la méthode de dénaturation de l'albumine de sérum bovin et les résultats ont été comparés à ceux de l'ibuprofène comme médicament standard. Les résultats sont illustrés dans la **figure 31**.

Les résultats révèlent que tous les extraits d'*E. altissima* présentent une activité anti-arthritique par inhibition de la dénaturation de la BSA et qui varie d'une manière dose dépendante. À une concentration de 1000 µg/ml, le pourcentage maximal d'effet inhibiteur a été observé dans l'extrait AcOEt (66,40 ± 3,76 %), suivi de l'extrait de *n*-BuOH (59,01 ± 0,95 %), puis de l'extrait EP avec le pourcentage minimum d'inhibition (33,65 ± 1,64 %). Le standard ibuprofène a exhibé une inhibition de 89,83 ± 0,29 % à la même concentration. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> des trois extraits et du standard sont présentées dans le **tableau 15**.

**Tableau 15** : L'activité anti-arthritique des différents extraits (EP, AcOEt et *n*-BuOH) d'*E. altissima*.

Extraits et standard	Activité anti-arthritique IC <sub>50</sub> (µg/ml)
EP	ND
AcOEt	126,43 ± 2,36 <sup>b</sup>
<i>n</i> -BuOH	237,62 ± 4,29 <sup>c</sup>
Ibuprofène	33,59 ± 1,47 <sup>a</sup>

Les valeurs représentent la moyenne de trois essais ± SD. L'analyse statistique est faite par le test *one way* ANOVA suivi par un *post-test* Tukey. Différentes petites lettres dans la colonne indiquent une différence significative (p≤0,05, n = 3). ND: non déterminé car l'inhibition à la concentration la plus élevée (1000 µg/ml) est inférieure à 50%.

Mahuang est un médicament isolé du genre *Ephedra* spécialement de l'espèce *E. sinica*, utilisé en médecine chinoise depuis 5000 ans pour guérir diverses maladies humaines, y compris l'inflammation (Rustaiyan *et al.*, 2011). Le genre *Ephedra* a également été utilisé en Russie pour traiter les troubles respiratoires et le rhumatisme pendant de nombreux siècles (Al-Snafi, 2017).

Au Japon, les plantes du genre *Ephedra* (*E. sinica*, *E. intermedia* et *E. quisetina*) sont utilisées à un taux d'environ 300 tonnes par an en raison de leur addition dans plusieurs médicaments sino-japonais largement utilisés dans le traitement de la fièvre, de la congestion nasale et de l'asthme ; des maladies inflammatoires chroniques des voies respiratoires (Kakiuchi *et al.*, 2011) et aussi dans le traitement du rhumatisme, des myalgies et des arthralgies, ou les effets analgésiques de ces médicaments résultent des propriétés anti-inflammatoires d'*Ephedra* (Batz *et al.*, 2012 ; Mi-Jung *et al.*, 2006).

L'analyse de corrélation a indiqué que l'activité anti-arthritique exercée par les extraits d'*E. altissima* est inversement corrélée avec la teneur en composés phénoliques et flavonoïdes. Ces résultats suggèrent que cette activité pourrait être due à la présence des composés phénoliques et des flavonoïdes.

Les composés phénoliques, les flavonoïdes, les proanthocyanidines, les alcaloïdes, les terpénoïdes et les stéroïdes sont généralement responsables de l'activité anti-inflammatoire des extraits des plantes. L'inhibition de la dénaturation des protéines peut être dû à l'interaction des flavonoïdes, tanins et alcaloïdes avec la région aliphatique autour du résidu de lysine sur la protéine albumine (Williams *et al.*, 2008).

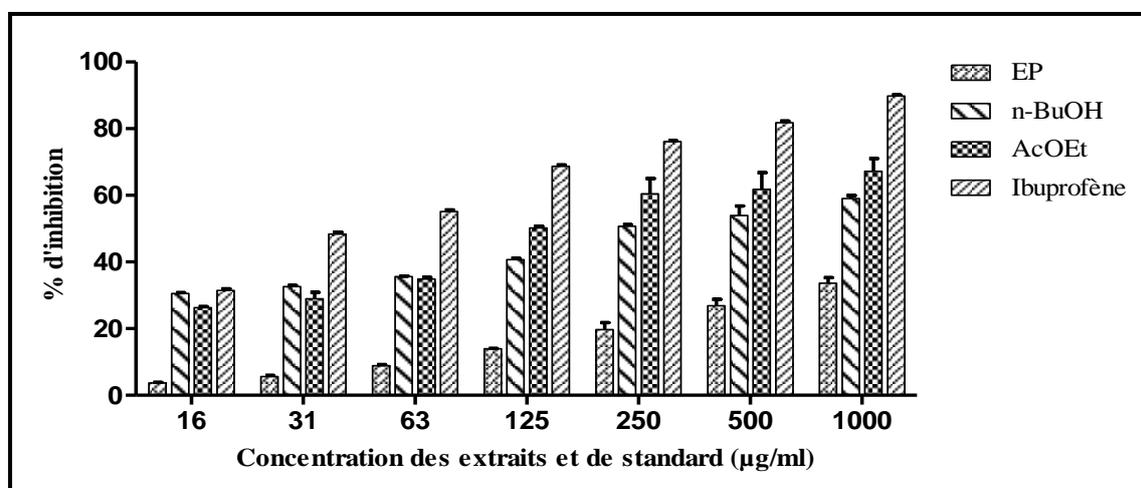


Figure 31: L'activité anti-arthritique des différents extraits (EP, AcOEt et *n*-BuOH) d'*E. altissima* (moyenne  $\pm$  SD).

Les flavonoïdes induisent une activité anti-inflammatoire par l'altération et la désactivation des radicaux libres (**Sasikumar et al., 2015**) et par l'inhibition de l'enzyme cyclooxygénase qui produit le médiateur inflammatoire ; la prostaglandine (**Berkey et al., 2011**). Certains flavonoïdes ont la capacité d'empêcher l'agrégation plaquettaire, réduisant ainsi l'effet de l'inflammation (**Dillard et German, 2000**).

Selon l'étude de **Rahman et al., (2015)** ; les flavonoïdes, les polyphénols et les stérols exercent leurs activités anti-inflammatoires et anti-arthritiques en réduisant l'indice d'arthrite et en abaissant les niveaux d'IL-1 $\beta$  et de TNF- $\alpha$  dans les tissus arthritiques enflammés des rats. Selon **Park et ses collaborateurs, (2014)**, les tanins ont révélé une activité anti-inflammatoire en inhibant la production des NO, TNF- $\alpha$ , IL-6 et PGE2. Egalement **Dande et al., (2010)** ont démontré que les saponines des extraits des plantes présentent une activité anti-inflammatoire.

Cependant, le pouvoir antioxydant des différents extraits de la plante *E. altissima* peut augmenter l'importance des résultats obtenus. En effet, plusieurs études ont identifié le stress oxydatif comme principale cause d'inflammation chronique et de maladies auto-immunes (**Kumagai et al., 2003; Del Buono et al., 2018**). Ainsi, la lutte contre le stress oxydatif peut prévenir l'apparition de cette maladie et réduire la gravité des symptômes observés. L'étude de **Ho et al., (2010)** a montré que les polyphénols possèdent une activité anti-inflammatoire se manifestant par leur activité antioxydante. Egalement, **Bauer et De la Fuente, (2016)** ont rapporté que l'oxydation et l'inflammation sont des processus interdépendants, car la surproduction des espèces réactives de l'oxygène (ERO) peut induire une réponse inflammatoire et les médiateurs inflammatoires peuvent induire un stress oxydatif.

Le stress oxydatif chronique est l'une des causes majeures pour la production d'auto-anticorps qui aboutit à des maladies auto-immunes (**Namazi, 2007**). Les radicaux libres peuvent endommager les cellules ou les tissus humains et peuvent conduire à des troubles physiologiques tels que le diabète, l'inflammation, le cancer et les troubles cardiovasculaires et neurologiques (**Rahman, 2007**). L'inflammation chronique est corrélée avec l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans les cellules (neutrophiles, monocytes, macrophages et éosinophiles) et à la diminution des enzymes antioxydantes (CAT, superoxyde dismutase, glutathion-peroxydase) (**Cervellati et al., 2013**).

### III.6. Activité inhibitrice de la lipase pancréatique

La capacité des extraits (EP, AcOEt et *n*-BuOH) d'*E. altissima* à inhiber la lipase pancréatique a été établie et les résultats sont présentes dans le **tableau 16** et la **figure 32**.

D'après ces résultats, tous les extraits présentent une activité inhibitrice de la lipase pancréatique qui varie d'une manière dose-dépendante. En effet, l'extrait AcOEt présente le meilleur effet anti-lipasique (IC<sub>50</sub> à 289,11±0,53 µg/ml), suivi de l'extrait *n*-BuOH (IC<sub>50</sub> à 327,48±1,18 µg/ml) et de l'extrait EP (IC<sub>50</sub> à 525,07±2,05 µg/ml). Selon ces résultats, les extraits obtenus de la plante *E. altissima*, en particulier l'extrait acétate d'éthyle et butanolique, peuvent être utilisés pour stimuler la perte de poids et traiter l'obésité.

**Tableau 16** : L'activité inhibitrice de la lipase pancréatique des différents extraits d'*E. altissima*

Extraits	Activité inhibitrice de la lipase pancréatique
	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
EP	525,07 ± 2,05 <sup>c</sup>
AcOEt	289,11 ± 0,53 <sup>a</sup>
<i>n</i> -BuOH	327,48 ± 1,18 <sup>b</sup>

Les valeurs sont la moyenne de trois essais ± SD. L'analyse statistique est faite par le test *one way* ANOVA suivi par un *post-test* Tukey. Différentes petites lettres dans la colonne indiquent une différence significative (p≤0,05, n = 3).

Nos résultats sont en accord ceux de **Shekelle et ses collaborateurs, (2003)** qui ont rapporté que l'utilisation des plantes *Ephedra* favorise la perte de poids dans des populations sélectionnées. **Hackman et al, (2006)** ont mentionné que l'utilisation des espèces du genre *Ephedra* diminue efficacement le poids corporel, la glycémie à jeun et les taux d'insuline chez des populations en surpoids et obèses en bonne santé.

Les espèces du genre *Ephedra* ont été vendues aux États-Unis pour stimuler la perte de poids et la performance athlétique (**Schulman, 2003**). Plusieurs études ont rapporté que l'administration des extraits d'*E. Sinica* réduit évidemment le gain de poids, le poids viscéral total et l'apport alimentaire (**Wang et al., 2007 ; Song et al., 2012 ; Kim et al., 2014**).

Euiiyin-tang est une préparation médicamenteuse coréenne contenant des plantes *Ephedra* a été fréquemment utilisée dans le traitement de l'obésité dans les hôpitaux et les cliniques coréens. Il a été prouvé par **Park et al, (2012)** que l'Euiiyin-tang diminue le poids corporel, les taux d'insuline et les lipides sanguins chez des souris obèses induites par un régime riche en graisses.

L'étude de **Song et ses collaborateurs, (2012)** a montré que l'*Ephedra sinica* supprimait le gain de poids sans réduction de la prise alimentaire. Egalement l'*Ephedra* réduit de manière significative l'IMC, le pourcentage de graisse et les taux de cholestérol total et de triglycérides dans des études chez l'homme (**Lee Y et Lee M, 2005 ; Park et al., 2005**).

L'effet anti-obésité de l'*Ephedra* a été attribué à l'éphédrine; un alcaloïde majoritaire trouvé dans le genre *Ephedra*, classé comme un agent thermogénique ayant une fonction de stimulation sur le nerf sympathique. Cet effet stimulant provoque une augmentation du taux métabolique basal qui contribue à la perte de poids (**Shekelle et al., 2003**).

Cependant, **Fan et al, (2015)** ont trouvé que non seulement les alcaloïdes isolés des espèces *Ephedra* ont un effet d'anti-obésité, mais les composants non alcaloïdes d'*Ephédra* exhibent un potentiel thérapeutique dans le traitement de l'hyperlipidémie, car ils peuvent améliorer le métabolisme des lipides, et ils peuvent également diminuer l'absorption des graisses afin de réduire les niveaux des lipides.

Les analyses de corrélation linéaire ont indiqué que l'activité inhibitrice de la lipase pancréatique exercée par les extraits d'*E. altissima* est corrélée négativement avec la teneur en composés phénoliques. Ces résultats suggèrent que cette activité pourrait être due à la présence des composés phénoliques.

L'activité anti-obésité exercée par les composés phénoliques peut être expliquée par plusieurs mécanismes, notamment l'interaction et l'inhibition des enzymes digestives telles que la lipase pancréatique (**Goncalves et al., 2011 ; Vazquez-Flores et al., 2017**). Des extraits riches en composés phénoliques de nombreuses plantes ont été révélés d'être des inhibiteurs efficaces de la lipase pancréatique (**Tiss et al., 2004 ; De la Garza et al., 2011; Won et al., 2007; You et al., 2012 ; Sakulnarmrat et Konczak, 2012; McDougall et al., 2009; Moreno et al., 2003; Gondoin et al., 2010**).

L'étude de **Martinez-Gonzalez et al, (2017a)** a montré que le site de liaison des composés phénoliques à la lipase pancréatique est composé principalement de quatre résidus d'acides aminés: Tyr115, Phe78, His152 et Phe216. Les principales interactions entre la lipase pancréatique et les composés phénoliques sont reconnues comme non covalentes (**Hackman et al., 2006**).

Les interactions entre les composés phénoliques et la lipase pancréatique étant réversible, principalement des liaisons hydrogène qui se sont formées entre les groupes polaires de la lipase pancréatique et les groupes hydroxyles des composés phénoliques et des

interactions  $\pi$ -empilement qui se forment entre les acides aminés aromatiques Phe et Tyr de la lipase pancréatique et les cycles aromatiques des composés phénoliques (Goncalves *et al.*, 2011 ; Martinez-Gonzalez *et al.*, 2017a). En effet, la capacité des composés phénoliques à interagir avec les protéines est associée à divers facteurs tels que le nombre de cycles aromatiques et le nombre des groupes hydroxyles libres présents dans leur structure (Martinez-Gonzalez *et al.*, 2017b).

La différence dans l'activité inhibitrice de la lipase pancréatique entre les extraits d'*E. altissima* pourrait s'expliquer par la différence des teneurs en composés bioactifs tels que les flavonoïdes et les acides phénoliques contenus dans chaque extrait. L'extrait AcOEt d'*E. altissima* contient plusieurs acides phénoliques tels que l'acide coumarique, ainsi que des flavonoïdes comme la quercétine, qui ont été rapporté parmi les meilleurs inhibiteurs de la lipase pancréatique (Sergent *et al.*, 2012; You *et al.*, 2012), ce qui peut justifier son meilleur effet anti-lipasique par rapport aux autres extraits.

L'effet inhibiteur des extraits d'*E. altissima* sur la lipase pancréatique peut être dû aux actions combinées des différents acides phénoliques par un effet synergique. En effet, Cai et ses collaborateurs, (2012) ont testé les interactions de chaque combinaison binaire d'acide férulique, d'acide caféique et d'acide p-coumarique sur l'inhibition de la lipase où l'acide p-coumarique et l'acide férulique ont été trouvé dans notre extrait AcOEt, une synergie a été observée, en particulier à forte concentration. Cependant, les interactions des combinaisons binaires de ces acides phénoliques ont été additives plutôt que synergiques lorsqu'elles ont été testées à de faibles concentrations. En raison des complications d'interaction entre les composés, les acides phénoliques peuvent avoir une interaction synergique lorsqu'ils sont contenus dans un extrait avec d'autres acides phénoliques, même si leur concentration est faible.

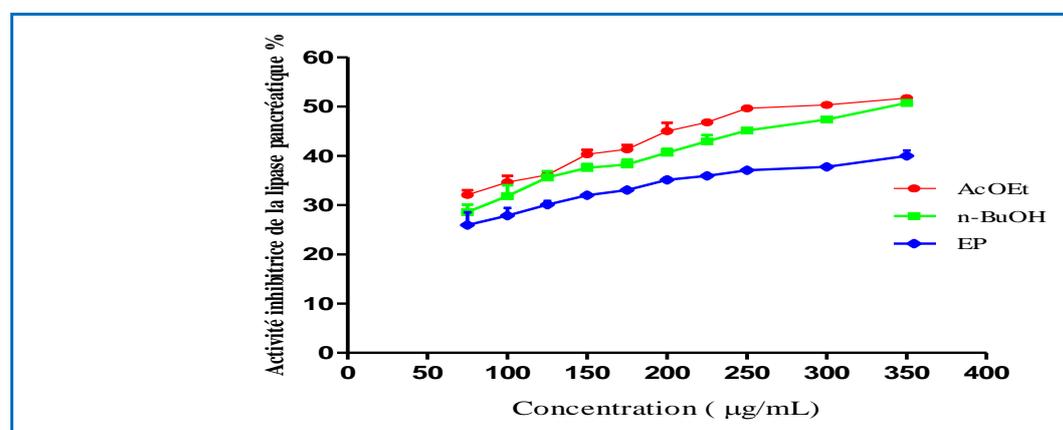


Figure 32: L'activité inhibitrice de la lipase pancréatique des différents extraits (EP, AcOEt et n-BuOH) d'*E. altissima* (Moyenne  $\pm$  SD).

### III.7. Activité inhibitrice de l'α-amylase

Les résultats ont révélé que tous les extraits d'*E. altissima* exhibent une activité inhibitrice de l'α-amylase d'une manière dose-dépendante. L'extrait AcOEt présente la plus forte activité inhibitrice de l'α-amylase (IC<sub>50</sub> à 8,07 ± 0,15 mg/ml), suivi de l'extrait *n*-BuOH (IC<sub>50</sub> à 14,697 ± 0,003 µg/ml) et comparé à l'acarbose (6,40 ± 0,24 µg/ml) comme standard. L'extrait EP montre une activité inhibitrice de l'α-amylase la plus faible, avec un pourcentage d'inhibition de 44,03±0,31 % à une concentration de 1000 µg/ml. Selon ces résultats, les extraits obtenus de la plante *E. altissima* peuvent être utilisés comme agents anti-diabétiques pour améliorer le contrôle de l'hyperglycémie postprandiale. Les résultats sont représentés dans le **tableau 17** et la **figure 33**.

**Tableau 17** : L'activité inhibitrice de l'α-amylase des différents extraits d'*E. altissima*.

Extraits et standard	Activité inhibitrice de l'α-amylase
	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
EP	ND
AcOEt	8,07 ± 0,15 <sup>b</sup>
<i>n</i> -BuOH	14,697 ± 0,003 <sup>c</sup>
Acarbose	6,40 ± 0,24 <sup>a</sup>

Les valeurs représentent la moyenne de trois essais ± SD. L'analyse statistique est faite par le test *one way* ANOVA suivi par un *post-test* Tukey. Différentes petites lettres dans la colonne indiquent une différence significative (p≤0,05). ND: non déterminé car l'inhibition à la concentration la plus élevée (1000 µg/ml) est inférieure à 50%.

Plusieurs études pharmacologiques antérieures ont révélé les effets bénéfiques des plantes du genre *Ephedra* comme des agents antidiabétiques y compris *E. alata*, *E. foliata*, *E. vulgaris*, *E. distachya* et *E. sinica* (Al-snafi, 2017 ; Chauhan *et al.*, 2010 ; Xiu *et al.*, 2001; Khaled, 2021).

L'analyse de corrélation a indiqué que l'activité inhibitrice de l'α-amylase est corrélée négativement avec la teneur en composés phénoliques et flavonoïdiques, ce qui suggère que cette activité inhibitrice pourrait être due à la présence des composés de type phénol et flavonoïdes. En accord avec ce résultat, l'étude de Ramkumar *et al.*, (2009) qui a montré que le contenu en composés phénoliques des feuilles de *Gymnema montanum* est corrélé avec l'effet inhibiteur de l'α-amylase.

Les polyphénols et les flavonoïdes font partie des agents antidiabétiques naturels connus par leur effet inhibiteur sur les enzymes hydrolysant les glucides en raison de leur

capacité de liaison aux protéines (Ganeshpurkar *et al.*, 2013). Des recherches antérieures ont montré que des composés phénoliques purifiés et des extraits phénoliques des plantes peuvent inhiber l'activité de l' $\alpha$ -amylase *in vitro* (McCue *et al.*, 2004 ; Gulati *et al.*, 2012).

Nombreux composés trouvés dans plusieurs espèces du genre *Ephedra* possèdent une activité inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase *in vitro*, parmi lesquels les terpénoïdes (Vinodhini *et al.*, 2015), les tanins (Chelladurai et Chinnachamy, 2018), les anthocyanes (Mohamed et Alliocide, 2008), les saponines (Mutiu *et al.*, 2013), des acides hydroxybenzoïques (Da Silva Pinto *et al.*, 2011), l'acide p-coumarique (Narita et Inouye, 2011), l'acide cinnamique (Hanamura *et al.*, 2005), le  $\beta$ -sitostérol (Mopuri *et al.*, 2018), le kaempférol (Rao *et al.*, 2007), la quercétine (Du *et al.*, 2006), la myricétine (Jagadeeswar *et al.*, 2003), la rutine et la catéchine (Dos Santos *et al.*, 2018).

L'obésité et le diabète de type 2 sont devenus les problèmes de santé humaine les plus courants dans le monde (Costacou et Mayer-Davis, 2003). Dans le diabète de type 2 lié à l'obésité, la perte de poids est difficile à atteindre car la plupart des médicaments anti-diabétiques stimule l'augmentation de poids (Chiasson *et al.*, 2002). Les extraits obtenus de la plante *E. altissima* présentent à la fois une activité anti-obésité et antidiabétique ainsi, l'utilisation de ces extraits peut être une bonne stratégie pour traiter le diabète de type 2 lié à l'obésité.

Les analyses de corrélation linéaire ont montré une forte corrélation positive entre l'activité inhibitrice de la lipase pancréatique et l'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase ( $R^2 = 0,99$ ). La contribution de l'obésité au diabète de type 2 peut être due à la dérégulation des adipocytokines synthétisées et sécrétées par le tissu adipeux (Trayhurn et Wood, 2004). Dans les adipocytes, la production de certains facteurs normalement synthétisés, tels que l'adiponectine, est diminuée, tandis que la libération d'autres adipocytokines, telles que le TNF- $\alpha$ , est accélérée (Ioannidis, 2008). L'adiponectine est une adipokine avec des propriétés anti-diabétiques et le TNF- $\alpha$  est un régulateur local puissant dans le tissu qui contribue à la résistance à l'insuline et à l'inflammation (Trayhurn et Wood, 2004). Ces troubles métaboliques sont régulés par le récepteur activé via les proliférateurs des peroxydases  $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ ), qui contrôle l'oxydation des acides gras, le métabolisme des lipides et des lipoprotéines et les réponses inflammatoires (Fruchart, 2009). L'analyse de l'expression génique a révélé que la plante *E. sinica* peut réguler positivement l'expression de l'adiponectine et de PPAR- $\alpha$  et diminue l'expression de TNF- $\alpha$ , suggèrent que *E. sinica* pourrait réduire l'obésité et l'hyperglycémie en augmentant l'adiponectine et le PPAR- $\alpha$  et en réduisant le TNF- $\alpha$  (Song *et al.*, 2012).

Les complications du diabète sont prévues pour se produire en raison du stress oxydatif dû à la formation des radicaux libres lors de l'oxydation du glucose et à la dégradation oxydative subséquente des protéines glyquées (Mehta *et al.*, 2006). Les patients diabétiques se sont avérés être sous stress oxydatif. Toutefois l'augmentation de la production des radicaux libres et la réduction de la défense anti-oxydante peuvent partiellement contribuer à l'apparition et à la progression des complications associées au diabète (Jin *et al.*, 2008).

Une corrélation entre l'activité antioxydante et l'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase des extraits de soja, a été rapportée par Mc Cue *et al.*, (2004). Ces derniers ont suggéré que les antioxydants présents dans les extraits de plantes peuvent affecter les 5 ponts disulfures situés sur la surface externe de l' $\alpha$ -amylase et induire une inhibition modérée par une légère modification dans la structure de l'enzyme. En conséquence, l'utilisation des antioxydants avec des médicaments antidiabétiques est fréquemment recommandée pour éviter de telles complications (Mehta *et al.*, 2006).

L'analyse statistique des valeurs d'IC<sub>50</sub> des différents extraits avec le test ANOVA suivi par le test Tukey a été faite dans le but de comparer les trois extraits avec le standard (tableau 12). Une différence significative a été trouvée entre les extraits et l'acarbose, ce qui signifie que les extraits d'*E. altissima* ont une activité inhibitrice modérée contre  $\alpha$ -amylase.

L'étude de Kwon *et al.*, (2007) a montré que les composés phytochimiques des plantes sont des inhibiteurs modérés de l' $\alpha$ -amylase, une propriété qui confère un avantage par rapport aux médicaments synthétiques qui inhibent fortement l' $\alpha$ -amylase et par conséquence entraînant une fermentation bactérienne anormale des glucides non digérés dans le côlon responsable des effets secondaires (Pinto *et al.*, 2009).

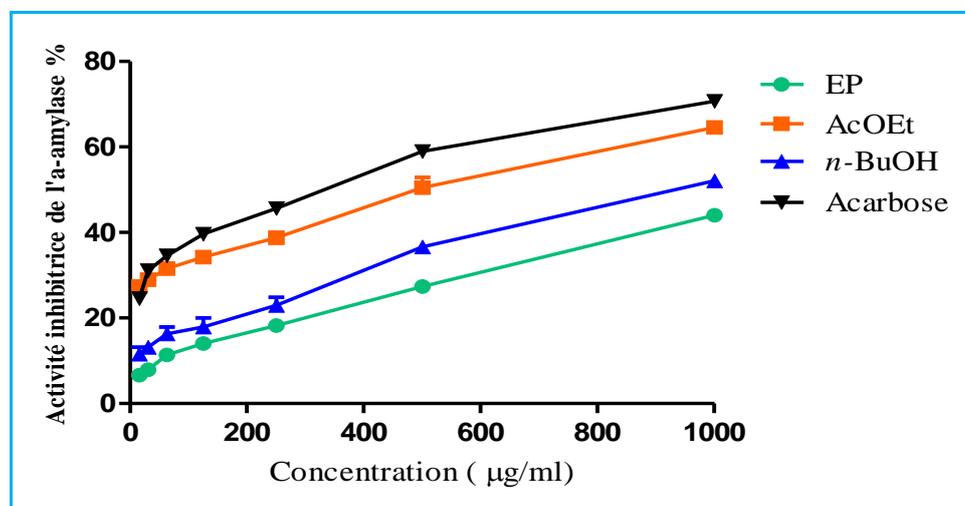


Figure 33: l'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase des différents extraits d'*E. altissima*. (Moyenne  $\pm$  SD).

### III.8. Digestion gastro-intestinale *in vitro*

Les composés polyphénoliques sont connus pour être utiles en tant que nutraceutiques ou suppléments pour la prévention de plusieurs maladies en raison de leur capacité antioxydante qui peut aider à ralentir le stress oxydatif généré lors des processus physiologiques (Tomé-Carneiro et Visioli, 2016).

Néanmoins, après l'ingestion, les polyphénols peuvent subir des transformations chimiques dues aux conditions physiologiques du tractus gastro-intestinal, affectant ainsi leurs propriétés bioactives. Cependant, pour que les polyphénols exercent leur activité biologique, ils doivent être bioaccessibles dans le tractus gastro-intestinal, puis être absorbés dans l'intestin grêle pour atteindre la circulation systémique, les tissus cibles et les organes de l'organisme (Gutiérrez-Grijalva *et al.*, 2016).

Les modèles de la digestion gastro-intestinale (DGI) *in vitro* sont des outils puissants pour simuler les conditions physiologiques de la digestion humaine. Ils sont actuellement utilisés comme première approche pour évaluer les changements de la stabilité et les activités biologiques des plantes (Lucas-Gonzalez *et al.*, 2016; Burgos-Edwards *et al.*, 2017).

Afin d'évaluer les modifications induites par la DGI, l'activité antioxydante des extraits (EP, AcOEt et *n*-BuOH) d'*E. altissima* a été déterminée avant et après la DGI *in vitro* avec deux tests différents ; le test de piégeage des radicaux libres ABTS $\cdot$  et le pouvoir réducteur du fer qui ont été exprimés en équivalent de Trolox (TEAC).

Le Trolox a été utilisé comme standard pour ses propriétés amphotères, il peut être dissous dans des milieux aqueux ou organiques (Arnao *et al.*, 2001). Les résultats des deux activités sont présentés dans le **tableau 18** et la **figure 34**.

Avant la digestion, les résultats ont montré que tous les extraits testés possèdent une capacité à piéger les radicaux libres ABTS $\cdot$  et de réduire le fer III en fer II, où l'extrait AcOEt exhibe les meilleures capacités de piégeage du radical ABTS $\cdot$  et de réduire le fer (déjà prouvé dans le test de FRAP) avec des valeurs de l'ordre de 11,64 $\pm$ 0,27  $\mu$ mol ET/g d'extrait et 7,8 $\pm$ 0,1  $\mu$ mol trolox/g respectivement suivi de l'extrait *n*-BuOH avec des valeurs 7,57 $\pm$ 0,14  $\mu$ mol ET/g d'extrait et 4,66 $\pm$ 0,06  $\mu$ mol trolox/g. L'extrait EP présente la plus faible activité antioxydant avec des valeurs de l'ordre de 5,71  $\mu$ mol ET/g d'extrait et 3,63  $\mu$ mol trolox/g respectivement.

L'étude réalisée sur les extraits aqueux et méthanolique d'*E. alata* poussant en Jordanie (46,6 et 60,2  $\mu$ mol TE/g) et l'extrait méthanolique d'*E. sinica* d'origine chinoise

(197,69  $\mu\text{mol Trolox/g}$ ) par le test TEAC a montré une capacité de piégeage des radicaux  $\text{ABTS}\cdot$  supérieure à celle obtenue dans le présent travail (Alali *et al.*, 2007 ; Song *et al.*, 2010).

L'activité anti-radicalaire des extraits vis-à-vis du radical  $\text{ABTS}\cdot$  est fortement corrélée au contenu en composés phénoliques ( $R^2= 0,96$ ). Une forte corrélation positive a été également observée entre le pouvoir réducteur du fer et la teneur en polyphénol ( $R^2=0,94$ ), par conséquent l'activité antioxydante des extraits peut être expliquée par la présence de composés phénoliques. Donc la différence dans l'activité antioxydante entre les trois extraits est due à leur quantité différente en polyphénols.

**Tableau 18** : La capacité antioxydante équivalente de Trolox (TEAC) déterminée par le test  $\text{ABTS}\cdot$  et le pouvoir réducteur du fer des différents extraits de la plante *E. altissima* avant et après la DGI *in vitro*.

	Test de piégeage des radicaux $\text{ABTS}\cdot^+$		Pouvoir réducteur du fer	
	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{mol TE/g}$ d'extrait	$\text{mmol trolox/g}$	$\mu\text{mol trolox/g}$ $\text{mmol trolox/kg}$
	<b>AcOEt</b>	46,52±1,07	11,64±0,27	0,0078±0,0001
<b>AcOEt contrôle</b>	25,44±0,85	6,37±0,21	0,0067±0,0002	6,67±0,15
<b>AcOEt B1 bile + pancréas</b>	24,27±0,75***	6,07±0,19***	0,0067±0,0002***	6,67±0,21***
<b>AcOEt B2 bile + pancréas</b>	24,56±0,19***	6,15±0,05***	0,0064±0,0001***	6,4±0,1***
<b>EP</b>	22,82±0,41	5,71±0,1	0,0036±0,0001	3,63±0,06
<b>EP contrôle</b>	37,53±0,11	9,64±0,03	0,0053±0,0001	5,53±0,12
<b>EP B1 bile + pancréas</b>	37,39±0,64***	9,36±0,16***	0,0052±0,0002***	5,2±0,17***
<b>EP B2 bile +pancréas</b>	38,71±0,26***	9,69±0,06***	0,0051±0,0001***	5,13±0,06***
<b>n-BuOH</b>	30,24±0,55	7,57±0,14	0,0047±0,0001	4,66±0,06
<b>n-BuOH contrôle</b>	28,09±0,21	7,13±0,05	0,0035±0,0001	3,5±0,1
<b>n-BuOH B1 bile + pancréas</b>	28,32±0,74**	7,09±0,19**	0,0035±0,0001***	3,53±0,06***
<b>n-BuOH B2 bile +pancréas</b>	28,59±0,41**	7,16±0,1**	0,0037±0,0001***	3,73±0,06***

Les valeurs représentent la moyenne de trois essais  $\pm$  SD. L'analyse statistique est faite par le test *one way* ANOVA suivi par un *post-test* Tukey. \*\*\*  $p\leq 0,001$ , \*\*  $p\leq 0,01$ .

Après la DGI, les activités antioxydantes de l'extrait AcOEt ont été réduites de 48,0 % pour la capacité antioxydante équivalente de Trolox (TEAC) déterminée par le test d'ABTS $\cdot$  et de 15 % pour le pouvoir réducteur du fer ( $p \leq 0,05$ ). Egalement, une diminution significative a été observée dans l'extrait *n*-BuOH après la digestion avec une réduction de 6,3 % ( $p \leq 0,05$ ) pour l'activité de piégeage des radicaux ABTS $\cdot$  et 24,0 % ( $p \leq 0,05$ ) pour le pouvoir réducteur du fer.

Cette diminution significative dans l'activité antioxydante par rapport à l'extrait non digéré peut être expliquée par la réduction dans les taux des polyphénols et des flavonoïdes après la digestion. Une réduction dans les teneurs en polyphénols et flavonoïdes après l'étape intestinale suivie d'une diminution significative dans l'activité antioxydante en comparaison avec un échantillon non digéré ont été également constatés dans plusieurs études (**Lucas-Gonzalez *et al.*, 2016 ; Burgos-Edwards *et al.*, 2017 ; Tavares *et al.*, 2012 et Gutiérrez-Grijalva *et al.*, 2017**).

L'étude menée par **Bergmann *et al.*, (2009)** a montré que le pH alcalin de l'étape de la digestion intestinale semble être lié à la diminution de la teneur en polyphénols et flavonoïdes. La biotransformation des composés parentaux présentés dans la fraction brute non digérée sous l'effet de la digestion gastro-intestinale, est principalement attribuée aux changements de pH à chaque phase digestive (**Antunes-Ricardo *et al.*, 2017 ; Wootton-Beard *et al.*, 2011**). La biotransformation des composés phénoliques au cours de leur passage gastro-intestinal pourrait affecter leur biodisponibilité et être liée aux modifications de leurs propriétés antioxydantes et bioactivité (**Del Rio *et al.*, 2010**).

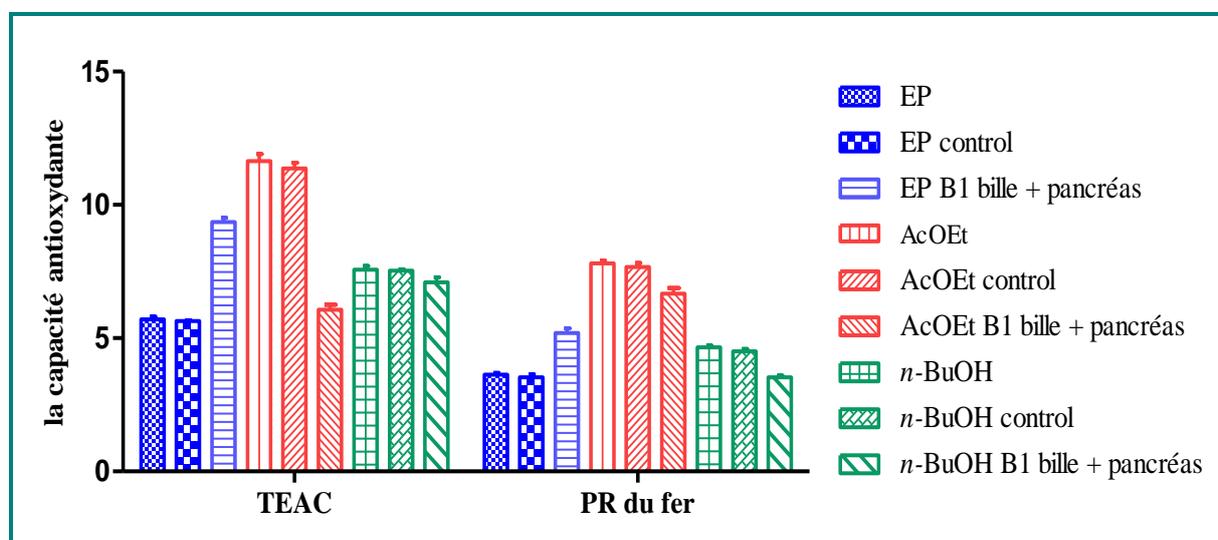
Afin de confirmer l'effet de changement de pH au cours de la DGI, un contrôle sans enzymes a été réalisé. Les résultats indiquent une diminution significative dans la capacité de piégeage des radicaux ABTS $\cdot$  et le pouvoir réducteur du fer en comparaison avec l'échantillon non digéré. Ces résultats sont en accord avec l'étude de **Thomas-Valdés *et al.*, (2018)** qui ont trouvé que l'activité antioxydante d'un contrôle sans enzymes déterminée par les tests FRAP et TEAC a été réduite après la DGI synchronisée d'une diminution des taux des polyphénols et flavonoïdes. Ce qui suggère que les changements de pH sont plus probablement responsables de la variation de la teneur en polyphénols et flavonoïdes que l'effet exercé par les enzymes digestives.

La dégradation enzymatique des polyphénols se produit principalement par la fermentation bactérienne dans le côlon plutôt que par les enzymes habituellement utilisées dans les modèles de la digestion *in vitro* (**Heim *et al.*, 2002**). Les changements de pH au cours

de tractus gastro-intestinal peuvent provoquer une oxydation et une racémisation des composés phénoliques, ce qui pourrait être la cause de la diminution de la teneur en polyphénols après la DGI *in vitro* (Gutiérrez-Grijalva *et al.*, 2017; Wootton-Beard *et al.*, 2011). Cependant, de nouvelles stratégies sont en cours d'élaboration afin d'éviter la dégradation des polyphénols lors de la digestion, telles que la micro et la nanoencapsulation avec différents polymères (Lewandowska *et al.*, 2013).

Cependant, nous avons observé une augmentation dans la capacité de piégeage des radicaux ABTS $\cdot$  et du pouvoir réducteur de fer de l'extrait EP après la DGI, par rapport à l'échantillon non digéré. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Gullon *et al.* (2015) qui ont rapporté que l'activité antioxydante de la farine de bagasse de pommes a été augmentée après la digestion *in vitro*. Egalement, Thomas-Valdés et ses collaborateurs, (2018) ont trouvé que les teneurs en polyphénols et flavonoïdes sont significativement plus élevées après la DGI ( $p < 0,05$ ). En raison de l'action enzymatique et des changements de pH lors de la digestion simulée, les composés phénoliques peuvent être hydrolysés et libérés progressivement de la matrice alimentaire (Bergmann *et al.*, 2009; Pavan *et al.*, 2014).

Le tractus gastro-intestinal est un site soumis à un stress oxydatif élevé en raison de son exposition accrue aux pro-oxydants alimentaires, tels que le fer, le cuivre, les peroxydes lipidiques et les nitrosamines, qui peuvent conduire à la formation d'espèces réactives causant des dommages oxydatifs (Halliwell, Zhao et Whiteman, 2000). Par conséquent, la présence de polyphénols dans l'extrait EP pourrait exercer une activité antioxydante et empêcher la formation d'espèces réactives nuisibles.



**Figure 34:** La capacité antioxydante équivalente en Trolox (TEAC) déterminée par le test ABTS $\cdot$  et le pouvoir réducteur du fer des différents extraits d'*E. altissima* avant et après la DGI *in vitro* (moyenne  $\pm$  SD).

### III.9. Activité antibactérienne

Le pouvoir antibactérien des extraits bruts obtenus de la plante *E. altissima* a été déterminé par la méthode de diffusion sur disques en milieu gélosé. Les résultats sont représentés dans le **tableau 19**.

L'activité antibactérienne des extraits a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits à tester vis-à-vis de sept souches bactériennes.

L'antibiogramme consiste à rechercher la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques. Le **tableau 20** reporte les valeurs en mm des zones d'inhibition atteintes avec les différentes souches étudiées. Il est à signaler que les différentes souches des bactéries étudiées réagissent différemment aux antibiotiques testés, même s'il s'agit de deux souches d'une même espèce bactérienne. Ceci est dû à la résistance aux antibiotiques.

Tous les extraits testés exercent une activité antibactérienne dose dépendante, car l'augmentation du diamètre des zones d'inhibition correspond à une augmentation de la concentration de l'extrait appliquée.

D'après ces résultats, une résistance a été observée avec l'extrait EP contre toutes les souches à Gram négatif testées, par contre il exerce une activité antibactérienne contre toutes les bactéries à Gram positif testées avec des valeurs de CMI correspondant à 12,5 µg/ml pour *Streptococcus mutans* et 50 µg/ml pour *Staphylococcus aureus*.

L'extrait acétate d'éthyle exerce un effet remarquable sur l'ensemble des souches testées à différentes concentrations avec des valeurs de CMI comprises entre (12,5 et 50 µg/ml) où *Staphylococcus aureus* et *E. coli* ATTC 25922 sont les souches les plus résistantes.

Les résultats montrent que l'extrait *n*-BuOH induit un effet antibactérien contre toutes les souches à Gram (-) testées et une souche de Gram (+) (*Streptococcus mutans*). *Pseudomonas aeruginosa* est la souche la plus sensible avec une valeur de CMI égale à 3,12 µg/ml, tandis que *E. coli* ATTC 25922 est la souche la plus résistante avec une valeur de CMI égale à 50 µg/ml. Les souches *Streptococcus pneumoniae* et *Staphylococcus aureus* sont résistantes aux différentes concentrations d'extrait.

**Tableau 19 :** Diamètre des zones d'inhibition de la croissance bactérienne par les extraits de la plante *Ephedra altissima* (en mm)

Extraits	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Souches à Gram-négatif				Souches à Gram-positif		
		<i>Escherichia coli</i> CIP 7624	<i>Escherichia coli</i> DSM 1103	<i>Escherichia coli</i> ATTC 25922	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> DMS 1117	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> ATTC 25923	<i>Streptococcus</i> <i>pneumoniae</i> ATTC 49619	<i>Streptococcus</i> <i>mutans</i> ATTC 25175
EP	100	-	-	-	-	8,66 $\pm$ 0,57***	13 $\pm$ 1***	13,33 $\pm$ 0,57***
	50	-	-	-	-	7,33 $\pm$ 0,58	9,33 $\pm$ 1,15	10,33 $\pm$ 0,58
	25	-	-	-	-	-	7 $\pm$ 1	9,33 $\pm$ 0,57
	12,5	-	-	-	-	-	-	8 $\pm$ 1
	6,25	-	-	-	-	-	-	-
CMI ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )		-	-	-	-	<b>50</b>	<b>25</b>	<b>12,50</b>
AcOEt	100	13,33 $\pm$ 1,15***	10,67 $\pm$ 1,15***	9,66 $\pm$ 2,88***	15,33 $\pm$ 1,15***	10,33 $\pm$ 0,57***	14,33 $\pm$ 1,52***	16 $\pm$ 1***
	50	9 $\pm$ 1	8 $\pm$ 1	7,0 $\pm$ 1	11 $\pm$ 1	8,66 $\pm$ 0,57	11,66 $\pm$ 0,57	10,33 $\pm$ 0,57
	25	7 $\pm$ 1	7,0 $\pm$ 1	-	9,33 $\pm$ 0,57	-	10 $\pm$ 1	9,33 $\pm$ 0,57
	12,5	-	-	-	8,0 $\pm$ 0,57	-	8,66 $\pm$ 1,15	8 $\pm$ 1
	6,25	-	-	-	-	-	-	-
CMI ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )		<b>25</b>	<b>25</b>	<b>50</b>	<b>12,5</b>	<b>50</b>	<b>12,5</b>	<b>12,50</b>
n-BuOH	100	14,33 $\pm$ 0,58***	14,33 $\pm$ 1,53***	17 $\pm$ 2,65***	28,0 $\pm$ 2,0***	-	-	13,66 $\pm$ 0,57***
	50	11 $\pm$ 1	12,67 $\pm$ 0,58	10 $\pm$ 2	24 $\pm$ 3,46	-	-	11,33 $\pm$ 0,57
	25	9,67 $\pm$ 0,58	10,33 $\pm$ 0,57	-	17,33 $\pm$ 2,3	-	-	8,33 $\pm$ 0,58
	12,5	8 $\pm$ 1	7,33 $\pm$ 0,58	-	9,66 $\pm$ 0,57	-	-	-
	6,25	-	-	-	8,0 $\pm$ 0,14	-	-	-
CMI ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )		<b>12,5</b>	<b>12,5</b>	<b>50</b>	<b>3,125</b>	-	-	<b>25</b>

(-) : pas d'inhibition.

Les comparaisons sont effectuées par le test ANOVA suivi d'un post test *tukey* entre le diamètre de la zone d'inhibition de l'antibiotique le plus actif pour chaque souche et celui obtenu par la concentration 100  $\mu\text{g/ml}$  de chaque extrait brut \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

**Tableau 20 :** Antibiogramme des germes étudiés en présence des différents antibiotiques (diamètre de la zone d'inhibition en mm)

	Souches à Gram-négatif				Souches à Gram-positif		
	<i>Escherichia coli</i> CIP 7624	<i>Escherichia coli</i> DSM 1103	<i>Escherichia coli</i> ATTC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DMS 1117	<i>Staphylococcus aureus</i> ATTC 25923	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATTC 49619	<i>Streptococcus mutans</i> ATTC 25175
Amoxicilline	20,33±1,53	14,66±1,52	9±1	18±2	48±1	26,33±1,52	23 ± 1,2
Céftazidine	8±1	8,66±1,52	10,66±1,52	18,66±1,52	Nd	35,33±2,08	Nd
Ciproflxacine	29±2	42,66±0,57	38±1	40,66±2,52	Nd	37,66±1,52	31 ± 0,12
Céfoxitine	Nd	Nd	Nd	Nd	25,66±1,52	21,66±1,52	Nd
Cotrimoxasole (sulfaméthoxazole)	23,33±1,53	26,66±1,52	7,33±0,57	35,33±2,51	37,66±2,51	25,33±0,57	11 ± 1,5
Oxacilline	Nd	Nd	Nd	Nd	23,66±2,51	24,66±2,08	21 ± 0,5
Tobramicine	Nd	Nd	Nd	Nd	36,33±1,52	R	Nd
Gentamicine	Nd	Nd	Nd	Nd	35,66±3,51	R	Nd
Rifampicine	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	33,33±2,08	Nd
Céfotaxime	20±1	35,66±1,52	18±1	29,33±2,51	Nd	Nd	Nd
Amoxicilline+acide clavumalique	18,66±1,52	8±1	8±1	19±3	Nd	Nd	Nd
Fosfomycine	Nd	Nd	Nd	Nd	29,66±2,51	Nd	Nd
Nitrofurane	Nd	Nd	Nd	Nd	41,66±2,08	Nd	Nd

Nd: non detecté

Pour *E. coli* (CIP 7624) et *E. coli* (DSM 1103), l'extrait *n*-BuOH montre un faible pouvoir inhibiteur en comparaison avec la ciprofloxacine et la cotrimoxasole mais un fort pouvoir inhibiteur en comparaison avec la céftazidine (Figures 35 et 36).

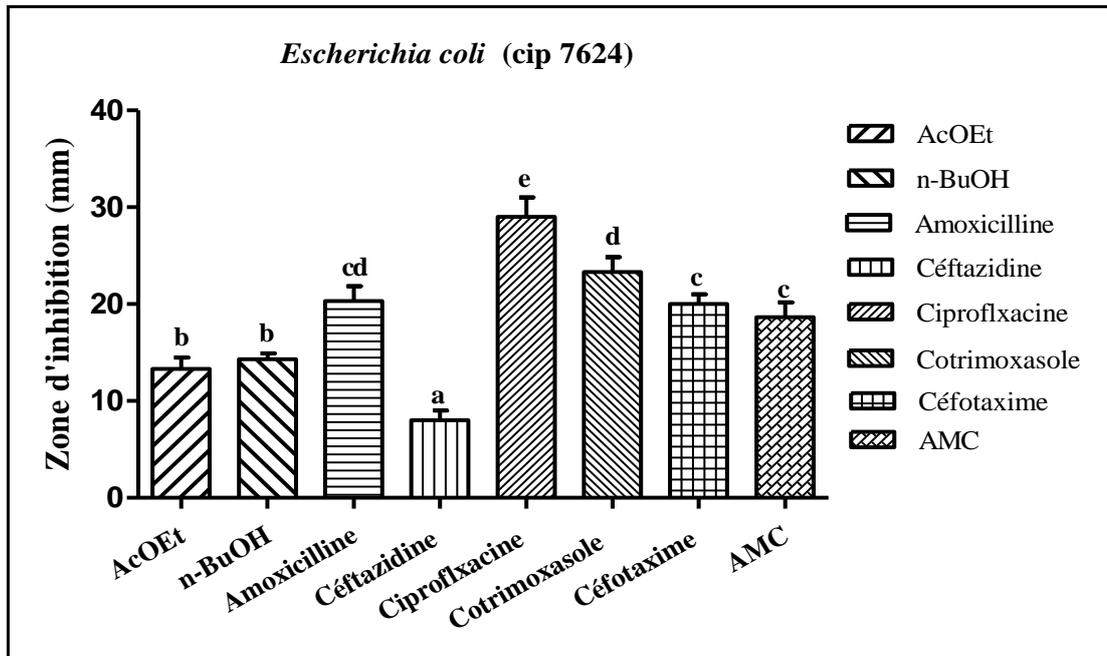


Figure 35: Pouvoir inhibiteur des différents extraits d'*E. altissima* et des standards sur la croissance d'*E. coli* (CIP 7624).

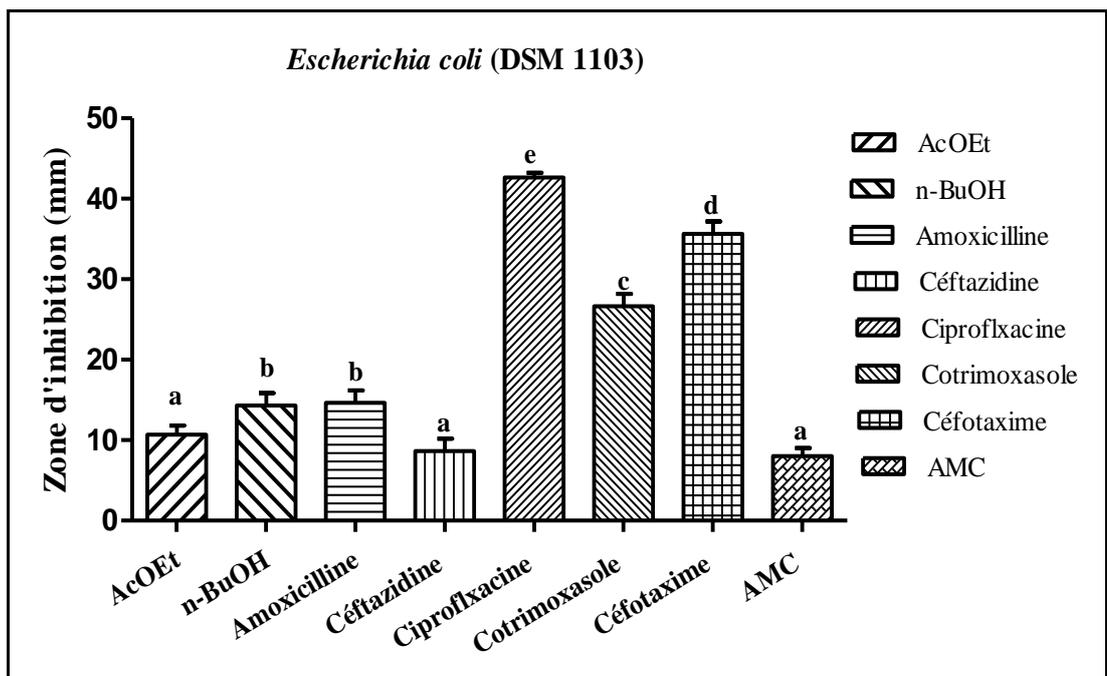


Figure 36: Pouvoir inhibiteur des différents extraits d'*E. altissima* et des standards sur la croissance d'*E. coli* (DSM 1103).

On constate également un faible pouvoir inhibiteur de l'extrait *n*-BuOH contre la croissance d'*E. coli* ATTC comparativement au ciprofloxacine, mais ils exercent un fort pouvoir inhibiteur en comparaison avec les autres standards testés (Figure 37).

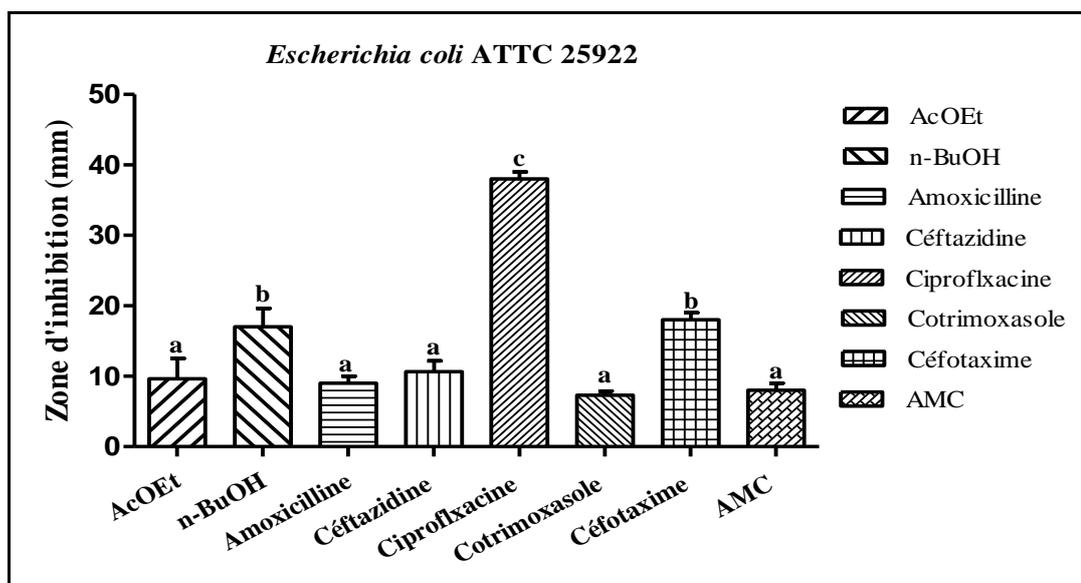


Figure 37: Pouvoir inhibiteur des différents extraits d'*E. altissima* et des standards sur la croissance d'*E. coli* (ATTC 25922).

Les résultats montrent un important pouvoir inhibiteur de l'extrait *n*-BuOH contre la souche *P. aeruginosa* ; aucune différence significative n'a été constatée par rapport au céfotaxime. Du point de vue du pouvoir inhibiteur, l'extrait *n*-BuOH et la céfotaxime forment entre eux un groupe homogène. C'est-à-dire qu'ils inhibent la croissance de *P. aeruginosa* avec la même puissance (Figure 38).

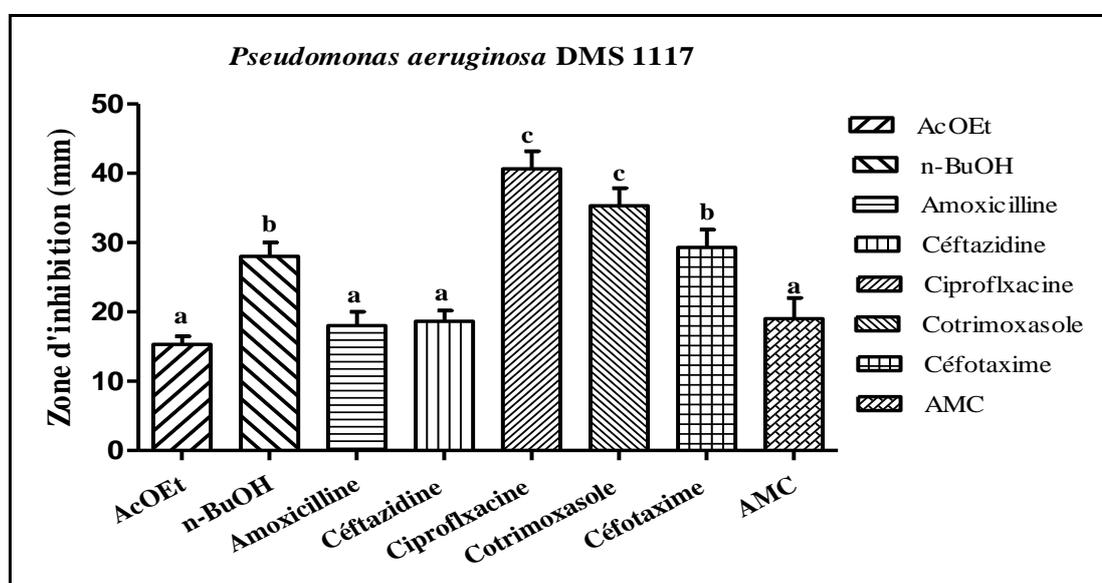


Figure 38: Pouvoir inhibiteur des différents extraits d'*E. altissima* et des standards sur la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 1117)

Un faible pouvoir inhibiteur des extraits a été constaté contre la croissance des souches *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* et *Streptococcus mutans* comparativement avec tous les standards testés (figures 39, 40 et 41).

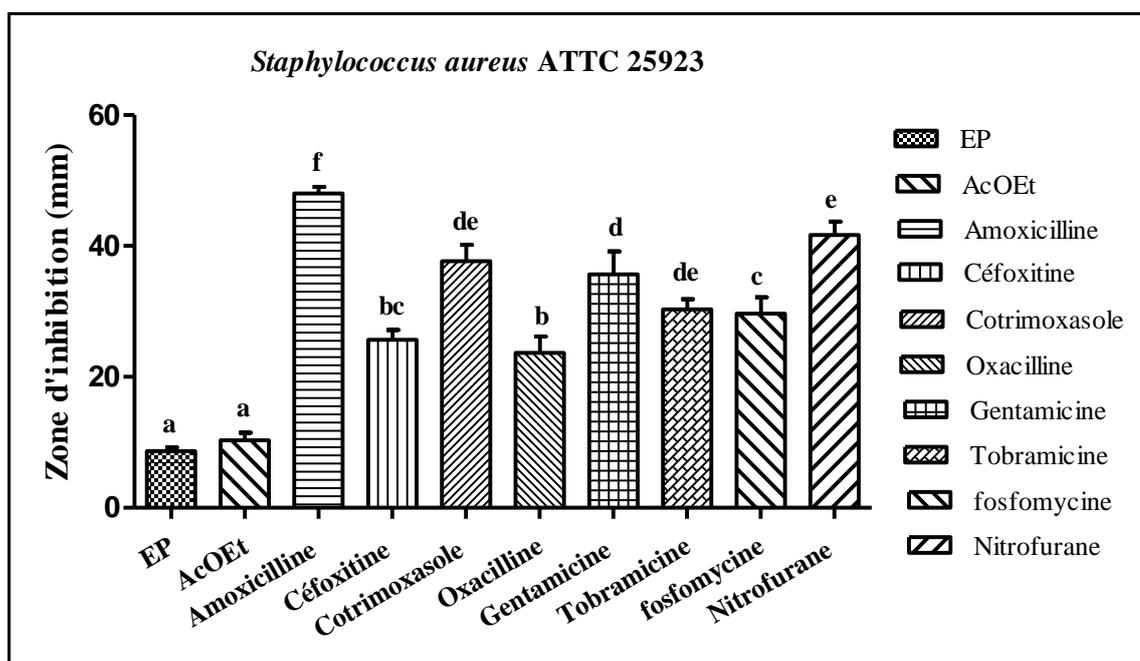


Figure 39: Pouvoir inhibiteur des différents extraits d'*E. altissima* et des standards sur la croissance de *Staphylococcus aureus*.

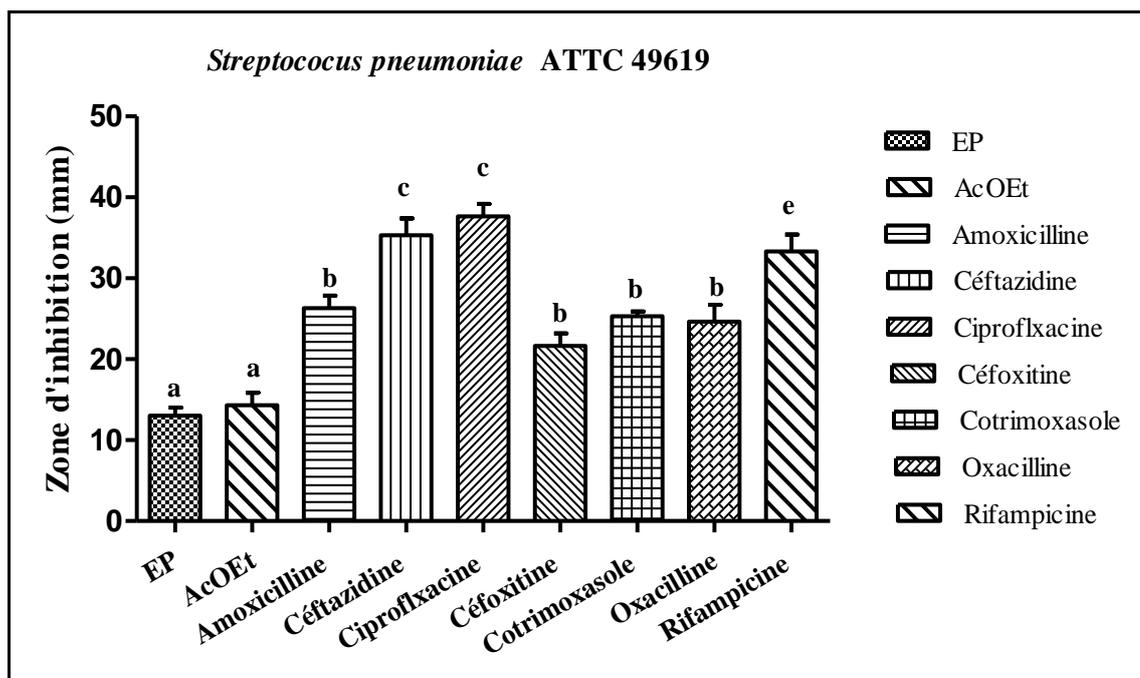
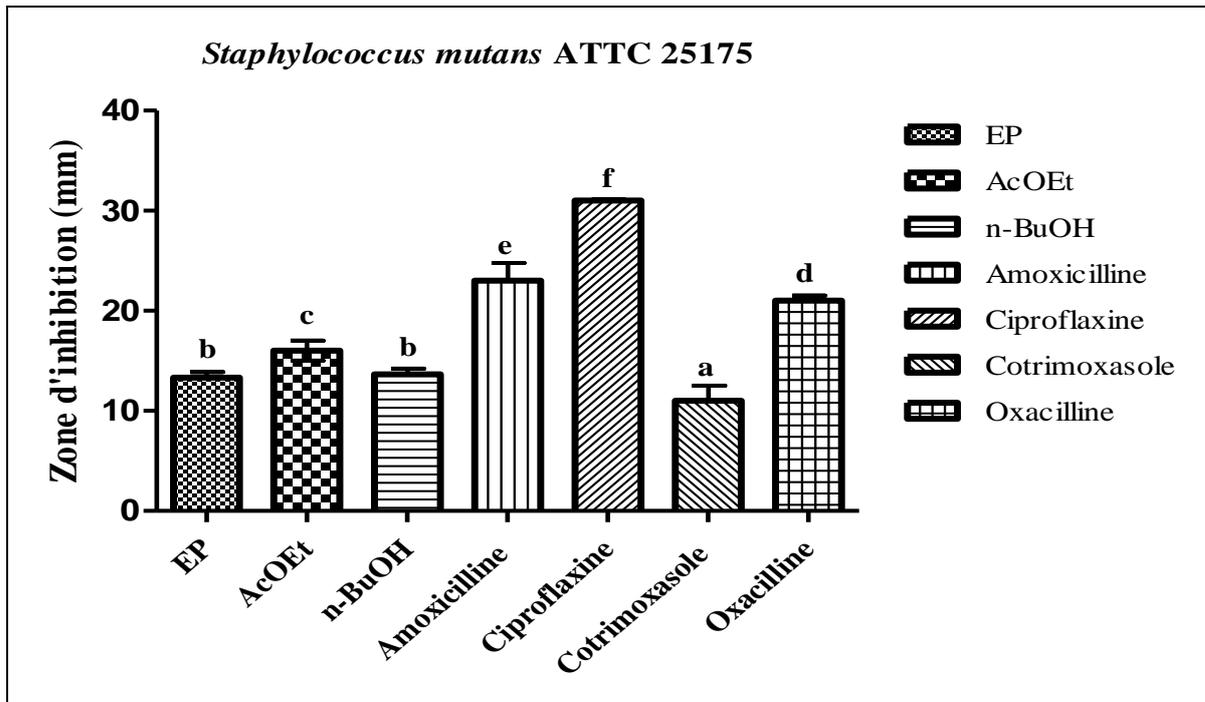


Figure 40: Pouvoir inhibiteur des différents extraits d'*E. altissima* et des standards sur la croissance de *Streptococcus pneumoniae*.



**Figure 41:** Pouvoir inhibiteur des différents extraits d'*E. altissima* et des standards sur la croissance de *Streptococcus mutans*.

L'étude menée par **Parsaeimehr et al., (2010)**, a indiqué que le meilleur pouvoir inhibiteur des extraits méthanoliques obtenus des parties aériennes de trois espèces du genre *Ephedra*; *E. pachyclada*, *E. procera* et *E. strobilacea* a été constaté contre *Pseudomonas aeruginosa*. Egalement, **Rustaiyan et ses collaborateurs, (2011a)** ont montré que l'extrait méthanolique d'*E. sarcocarpa* rencontrée en Iran a une activité intéressante contre les souches *E. coli* et *P. aeruginosa*, ce qui est en accord avec les résultats trouvés pour l'extrait butanolique dans la présente étude.

Les résultats obtenus par des études antérieures ont montré que l'extrait acétonitrile de l'*E. alata* poussant en Egypte présente une forte activité contre des bactéries à Gram (+) et à Gram (-) (**Ghanem et El-Magly, 2008**), tandis que les extraits butanolique, acétate d'éthyle et dichlorométhanolique d'*E. alata* de la région d'Ouargla présentent une activité plus ou moins importante sur la croissance des bactéries à Gram (+) et à Gram (-) selon la souche ciblée (**Chebouat et al., 2014**).

Les extraits éthanolique et méthanolique préparés à partir de l'espèce *E. gerardiana* ont montré une activité antibactérienne contre diverses espèces bactériennes, y compris *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *E. coli* (**Kumar, 2011; Walter et al., 2011**).

L'activité antimicrobienne de certaines espèces du genre *Ephedra* a été également prouvée dans de nombreuses études ; *E. transitorai* (Al-Khalil, 1998), *E. sinicia* (Kwon *et al.*, 2001), *E. breana* (Feresin *et al.*, 2001), *E. intermedia* (Bonjar *et al.*, 2004], *E. nebrodensis* (Cottiglia *et al.*, 2005), *E. pachyclada* (Motomura *et al.*, 2007 ; Lee et Lee, 2009 ; Mahdavi *et al.*, 2010; Khalil *et al.*, 2021), *E. americana* (Bussmanna *et al.*, 2008; Bussmanna *et al.*, 2010), *E. laristanica* (Rustaiyan *et al.*, 2011b) et *E. aphylla* (El-Zayat *et al.*, 2021).

L'activité antibactérienne observée dans les extraits pourrait être due à la présence de différentes classes de métabolites secondaires connus par leurs activités antibactériennes à savoir les flavonoïdes notamment les flavanones et les isoflavonoïdes (Wächter *et al.*, 1999; Dhayakaran *et al.*, 2015), les tanins, les acides phénoliques et les terpènes (Bruneton, 1993 ; Elegami *et al.*, 2002 ; Hatano *et al.*, 2005 ; Surveswaran *et al.*, 2007).

De nombreux travaux ont rapporté les effets antibactériens des composés phénoliques à l'égard de nombreuses souches bactériennes (Ahmad et Beg, 2001 ; Aboaba *et al.*, 2001 ; Rodríguez *et al.*, 2009). Le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est très complexe, y compris l'inhibition des enzymes extracellulaires microbiens, la séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne ou la chélation de métaux tels que le fer et l'inhibition de métabolisme microbien.

Les composés phénoliques peuvent interagir avec les protéines membranaires des bactéries par le biais de liaisons hydrogène via leurs groupes hydroxyles, ce qui peut entraîner des modifications de la perméabilité de la membrane et provoquer la destruction des cellules. Ils peuvent également pénétrer dans les cellules bactériennes et coaguler le contenu cellulaire (Tian *et al.*, 2009). L'extrait *n*-BuOH contient une quantité appréciable de polyphénols mais il n'a montré aucune activité inhibitrice sur les souches *Streptococcus pneumoniae* et *Staphylococcus aureus*, il se pourrait que son activité soit masquée par la présence des sucres.

L'activité antibactérienne des flavonoïdes est probablement due à leurs capacités de former des complexes avec des protéines extracellulaires de la paroi cellulaire bactérienne (Doss *et al.*, 2011). Les flavonoïdes peuvent inhiber la croissance bactérienne en utilisant différents mécanismes, dont l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques, en particulier les flavonoïdes avec hydroxylation du cycle B (Plaper *et al.*, 2003) et l'inhibition des fonctions de la membrane cytoplasmique (Scazzocchio *et al.*, 2006).

La quercétine est présente dans l'extrait AcOEt, cette substance pourrait contribuer à son activité antibactérienne (Shan *et al.*, 2007). Diverses études ont indiqué que l'activité

antibactérienne de la quercétine contre *E. coli* pourrait être au moins partiellement attribuée à l'inhibition de l'ADN gyrase et inhibe son activité ATPase (**Plaper et al., 2003**).

L'étude de **Chung et al., (1993)** a mentionné que les tanins peuvent être toxiques pour les champignons filamenteux, les levures et les bactéries. En général, les tanins semblent affectés la croissance et la virulence des bactéries selon plusieurs mécanismes, tels que l'inhibition des enzymes extracellulaires (**Schofield et al., 2001**).

La variation de la composition chimique des extraits explique les variations observées dans l'activité antibactérienne entre eux. L'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif principal, mais à l'action combinée (synergie) de différents composés à l'origine de cet extrait (**Essawi et Srour, 2000**).

Concernant l'extrait EP, malgré sa teneur faible en flavonoïdes, il montre une activité antibactérienne remarquable. L'activité antibactérienne de l'extrait EP sur les bactéries à Gram (+) pourrait s'expliquer par la présence probable des huiles essentielles, des coumarines et des triterpènes (**yukiko et al., 2002 ; Soharb et al., 2001 ; Surveswaran et al., 2007**).

L'absence de l'activité antibactérienne contre certaines souches pour les extraits EP et *n*-BuOH pourrait être expliquée par la mauvaise méthode adoptée ou/et la nature des solvants organiques utilisés dans l'extraction des molécules actives. En effet, l'étude de **Hayouni et al., (2007)** a montré que la méthode d'extraction et la nature des solvants utilisés peuvent influencer l'activité antibactérienne des composés phénoliques. Toutefois, il est toujours possible que l'ajout de DMSO à un extrait végétal diminue son activité antibactérienne.

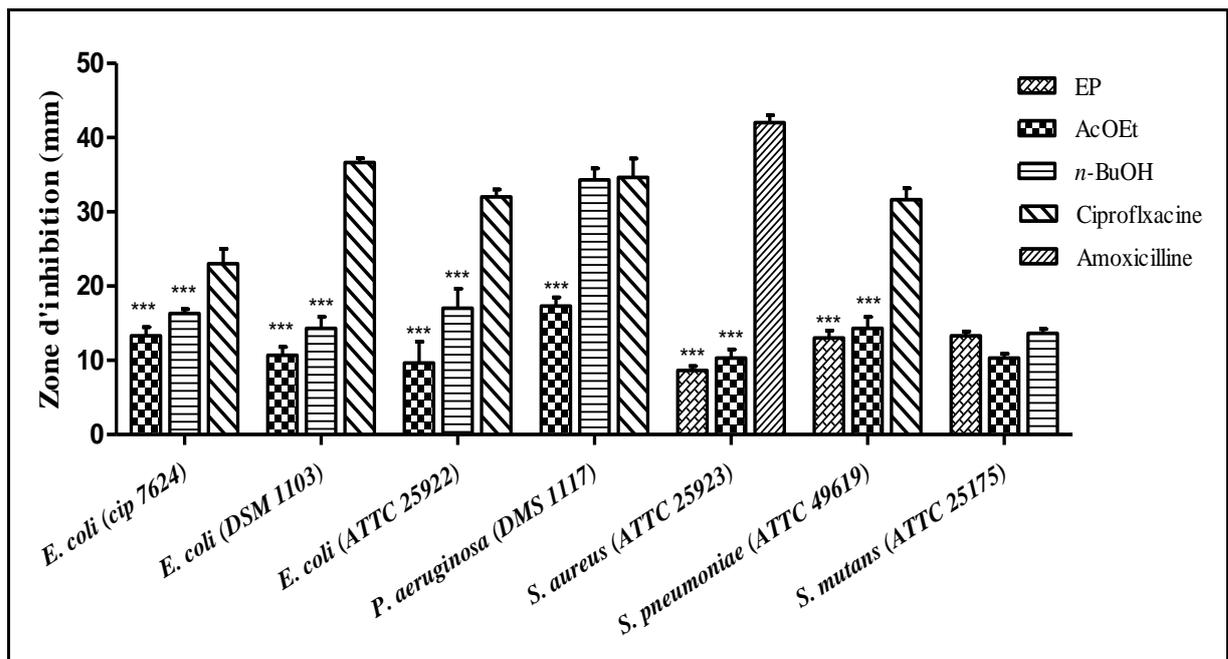
La méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité antibactérienne serait un autre facteur qui influe aussi sur les résultats obtenus. Les études de **Natarajan et al., (2005)** et **Fazeli et al., (2007)** ont constaté que la méthode de diffusion à partir des puits sur gélose est plus adaptée pour étudier l'activité des extraits aqueux et organiques des plantes que la méthode de diffusion en milieu gélosé. Dans notre cas, c'est la méthode de disque qui a été adoptée et il se pourrait qu'elle ait influencé négativement sur les résultats de l'extrait *n*-BuOH contre les bactéries à Gram positif.

La plante peut avoir une activité antibactérienne *in vivo* même si elle ne possède pas une activité *in vitro*. Certains métabolites de la plante peuvent être actifs sans être métabolisés et dans ce cas leur activité *in vitro* et *in vivo* sera détectables. Toutefois, plusieurs composés ne sont actifs qu'après leur métabolisation et dans ce cas ils seront inactifs *in vitro* alors qu'ils sont actifs *in vivo* (**Choi et al., 2011; Peng et al., 2014 ; Taha, 2013**). Deux composés

exercent une activité antibactérienne contre *Salmonella typhimurium* ; le N-nitrosoephedrine et le 2- (N-nitroso-méthylamino) propiophénone (NMAP) ont été identifiés par **triker et ses collaborateurs, (1987)** dans un extrait de thé nitrosé fabriqué à partir de la plante *Ephedra altissima* dans des conditions *in vivo*.

Il apparaît que les souches à Gram positif sont les bactéries les plus sensibles par rapport aux autres souches à Gram négatif; ceci peut être attribué à la différence structurale entre les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif. La paroi cellulaire des bactéries Gram (+) est constituée d'une seule couche alors que la paroi cellulaire des Gram (-) a une structure multicouche liée à une membrane cellulaire externe (**David et Sudarsanam, 2013**).

Les isolats cliniques de *Staphylococcus aureus*, principale cause d'infections nosocomiales, sont de plus en plus résistants à un grand nombre d'agents antimicrobiens tels que la pénicilline, la gentamicine, la tobramycine, la ciprofloxacine (**Lowy, 2003**). Alors que les agents anti-staphylocoques efficaces existent encore, leur durée de vie est susceptible d'être limitée. Donc, de nouvelles approches à la thérapie et la prévention vont devenir de plus en plus importantes, notons que l'effet inhibiteur des extraits EP et AcOEt contre cette souche est très important.



**Figure 42:** Activité antibactérienne des extraits et des standards exprimés en diamètres de zones d'inhibition (mm).

### III.10. Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-ESI-MS/MS)

L'analyse de différents extraits d'*E. altissima* par LC-DAD-ESI/MS, en phase inverse a révélé la présence d'un grand nombre de métabolites secondaires. Leur identification est faite à partir de l'interprétation de leurs spectres MS et par la comparaison de leurs temps de rétention et les spectres UV-visible obtenus avec ceux des standards de références ainsi que les données rapportés dans la bibliographie. L'analyse des composés en spectrométrie de masse a été conduite selon les deux modes d'ionisation (mode positif et mode négatif). Par ailleurs, dans le mode négatif, la fragmentation des composés présents dans l'extrait est plus sensible et de meilleure qualité.

Les chromatogrammes des extraits bruts obtenus par LC-DAD-ESI/MS, sont présentés dans les figures (43 et 44). Les pics sont numérotés selon leur ordre d'élution. Les spectres UV-Vis et de masses obtenues ont montré que d'*E. altissima* caractérisée par la présence de dix-neuf composés différents, huit sont des acides phénoliques simples et des dérivés d'acide phénolique (composés 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 14), et onze sont des flavonoïdes liés à des groupes glycosyles (composés 6, 8, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19).

Les données LC/MS des composés caractérisés, à savoir le temps de rétention ( $t_R$ ), la longueur d'onde maximale d'absorption ( $\lambda_{max}$ ), les ions pseudomoléculaires  $[M - H]^-$ , les fragments obtenus MS et l'attribution de chaque pic sont présentés dans le **tableau 21**.

Parmi les acides phénoliques, les composés 1, 3, 5, 7, 10 et 14 ont été identifiés respectivement comme l'acide gallique, l'acide protocatéchique, l'acide p-hydroxybenzoïque, l'acide p-hydroxybenzaldhyde, l'acide coumarique et l'acide férulique en comparaison avec les standards. L'acide coumarique (Nawwar *et al.*, 1985; Hussein *et al.*, 1997), les acides p-hydroxybenzoïque et protocatéchique (Hussein *et al.*, 1997; Chumbalov *et al.*, 1977) ont été décrits précédemment dans *E. alata*, *E. aphylla* et *E. equisetina*.

Le pic 2 montre une absorption maximale UV à 259 et 294 nm et un ion pseudomoléculaire  $[M - H]^-$  à  $m/z=315$ . La fragmentation MS/MS donne deux fragments à  $m/z=153$  et 109. Le premier fragment à  $m/z=153$  correspond à la molécule d'acide protocatéchique résultant de la perte d'une molécule d'hexose  $[M-H-162]^-$  et sa décarboxylation génère le fragment à  $m/z=109$   $[M-H-162-44]^-$ . Ces données ainsi que les spectres d'absorption (257, 291 nm) et la valeur  $[M - H]^-$  ( $m/z=315$ ) rapportée par Chen *et al.*, (2012) permettent d'identifier le composé 2 comme étant l'acide protocatéchique glucoside.

Le pic **4** ( $t_R=17,79$  min) indique un ion pseudomoléculaire  $[M - H]^-$  à  $m/z=355$ . Sa décomposition génère un fragment à  $m/z=193$  correspond à la molécule d'acide férulique  $[M-H-162]^-$ , par conséquent le composé **4** a été identifié comme étant l'acide férulique glucoside qui a été précédemment rapporté par **Ek et al., (2006)**. Les acides férulique et protocatéchique glucosides ont été décrits pour la première fois dans les plantes du genre *Ephedra*.

Les composés restant ont été déterminés comme des flavonoïdes, tels que les flavonols (dérivés de la quercétine et du kaempférol) et les flavones (dérivés de l'apigénine et de la lutéoline) et les isoflavones (dérivés de la biochanine A).

Les composés **6, 9, 12, 13** et **17** qui présentent des temps de rétention 22,81 min, 28,83 min, 30,34 min, 30,39 min et 36,88 min respectivement ont été caractérisés comme étant des dérivés d'apigénine. Le composé **13** montre un spectre de masse dans lequel on observe un ion pseudomoléculaire  $[M - H]^-$  à  $m/z=431$  dont la fragmentation fait apparaître un pic d'ion fragment à  $m/z=311$   $[M-H-120]^-$ . Ce composé a été élucidé comme apigénine-8-C-glucoside (vitexine) en comparaison avec les standards. La vitexine a été également trouvée dans les extraits d'*E. campylopoda* (**Kallassy et al., 2017**).

En comparaison avec la vitexine, le composé **12** présente un ion pseudomoléculaire  $[M - H]^-$  à  $m/z=593$  et libérant un ion fragment  $MS^2$  à  $m/z=431$ , a été identifié comme étant la vitexine-*O*-glucoside, qui a été précédemment rapportée dans les feuilles d'aubépine (**Zhang et al., 2010**).

L'analyse du spectre de masse du composé attribué au pic **17** permet d'observer un ion pseudomoléculaire  $[M - H]^-$  à  $m/z=577$ . La fragmentation  $MS^2$  de l'ion parental engendre des pics d'ions fragments à  $m/z=341$ , 323 et 293 correspondant à la perte d'une molécule de rhamnose (146), d'un fragment (90) uma et d'eau (18), qui sont caractéristiques des dérivés du 6-C-glucoside-*O*-rhamnoside (**Hassan et al., 2019**). Il a été identifié comme l'apigénine-6-C-glucoside-2'-rhamnoside (isovitexine-2-*O*-rhamnoside) en comparaison avec les standards. Ce composé a été décrit précédemment dans les extraits d'*E. aphylla* (**Hussein et al., 1997**), *E. alata* (**Nawwar et al., 1984**) et *E. sinica* (**Amakura et al., 2013**).

Le composé **9** présente un ion pseudomoléculaire  $[M - H]^-$  à  $m/z=563$  dont la fragmentation fait apparaître des pics d'ions fragments  $MS^2$  à  $m/z=503$   $[M-H-60]^-$ , 473  $[M-H-90]^-$ , 443  $[M-H-120]^-$ , 353  $[M-H-120-90]^-$ ; le profil de fragmentation est caractéristique du di-C-glycoside. Donc, à partir de ces données et les informations rapportées par **Illorent-**

**Martinez et al., (2015)**, le composé **9** a été provisoirement identifié comme l'apigénine-6-*C*-pentoside-8-*C*-hexoside.

Le composé **6** présente un ion pseudomoléculaire  $[M - H]^-$  à  $m/z=593$ . La fragmentation a donné des fragments à  $m/z=575 [(M - H) - 18]^-$  et  $503 [(M - H) - 90]^-$  et un pic de base à  $m/z=473 [(M - H) - 120]^-$ , présentant un motif de fragmentation caractéristique des flavones di-*C*-glycoside. Les ions à  $m/z=353 [(M - H) - (120 + 120)]^-$  et  $383 [(M - H) - (90 + 120)]^-$  suggèrent la présence d'apigénine (MW=270) comme aglycone et deux molécules d'hexoses (glucoses) (**Hassan et al., 2019**). Il a été identifié comme l'apigénine 6,8-di-*C*-glucoside (vicénine-2) en comparaison avec les standards. La vicénine II a été trouvé précédemment dans l'extrait éthanolique *E. aphylla* (**Hussein et al., 1997**), *E. alata* (**Nawwar et al., 1984**) et *E. sinica* (**Amakura et al., 2013**)

En se base sur les données MS<sup>2</sup> et les données bibliographiques, le pic **8** ( $t_R=26,58$  min) ayant une absorption maximale UV à 269 et 347 nm et un ion pseudomoléculaire  $[M - H]^-$  à  $m/z=447$  a été élucidé comme la luteoline-6-*C*-glucoside (isoorientine). La présence d'un ion fragment à  $m/z=429 [(M - H)-18]^-$  est caractéristique de l'isoorientine. Ce fragment est absent dans le cas de l'orientine (**Hassan et al., 2019**).

La fragmentation du composé **11** ( $m/z=609$ ) élué à  $t_R=29,64$  min conduit à des fragments à  $m/z=447 [(M - H)-162]^-$  et 327. Sur la base des informations rapportées par **Wojakowska et al., (2013)**, le composé **11** a été provisoirement identifié comme étant la lutéoline 6-*C*-hexoside-*O*-hexoside

Le composé **15** est identifié comme étant la quercétine-3-*O*-rhamnoside ( $m/z=447$  et  $\lambda_{max}$  255, 347 nm). Sa décomposition donne un fragment à  $m/z$  301  $[(M - H) - 146]^-$  résultant de la perte d'un rhamnose, tandis que le composé **18** ( $\lambda_{max}$  264, 346 nm) est identifié comme étant le kaempférol-3-*O*-rhamnoside. Sa fragmentation en mode négatif génère un pic d'ion fragment MS<sup>2</sup> à  $m/z=285$  caractéristique du noyau flavonoïde kaempférol. Les deux composés ont été identifiés au kaempferol-3-*O*-rhamnoside et la quercetin-3-*O*-rhamnoside en comparaison avec les standards. Ces deux méabolites secondaires ont été précédemment décrits dans l'espèce *E. alata* (**Nawwar et al., 1984**)

Le pic **16** présente un ion pseudomoléculaire  $[M - H]^-$  à  $m/z=607$ . Ses fragments obtenus par MS/MS à  $m/z=445$  et 283 sont le résultat de la perte successive de deux groupements glycosyles. Ce composé a été identifié comme la biochanine A *O*-hexoside-*O*-hexoside qui a été précédemment élucidé par **Roriz et al., (2015)** dans la plante *Pterospartum tridentatum*.

La fragmentation de composé **19** ( $m/z=721$ ) élué à  $t_R=38,84$  min donne des fragments à  $m/z=445$  et 283, suggérant qu'il pourrait être un dérivé de la biochanine A-*O*-hexoside. La biochanine A 7-*O*-glucoside (sissotrine) et leur dérivé ont également été décrits dans les extraits éthanoliques des parties aérienne d'*E. alata* (Ziani *et al.*, 2019).

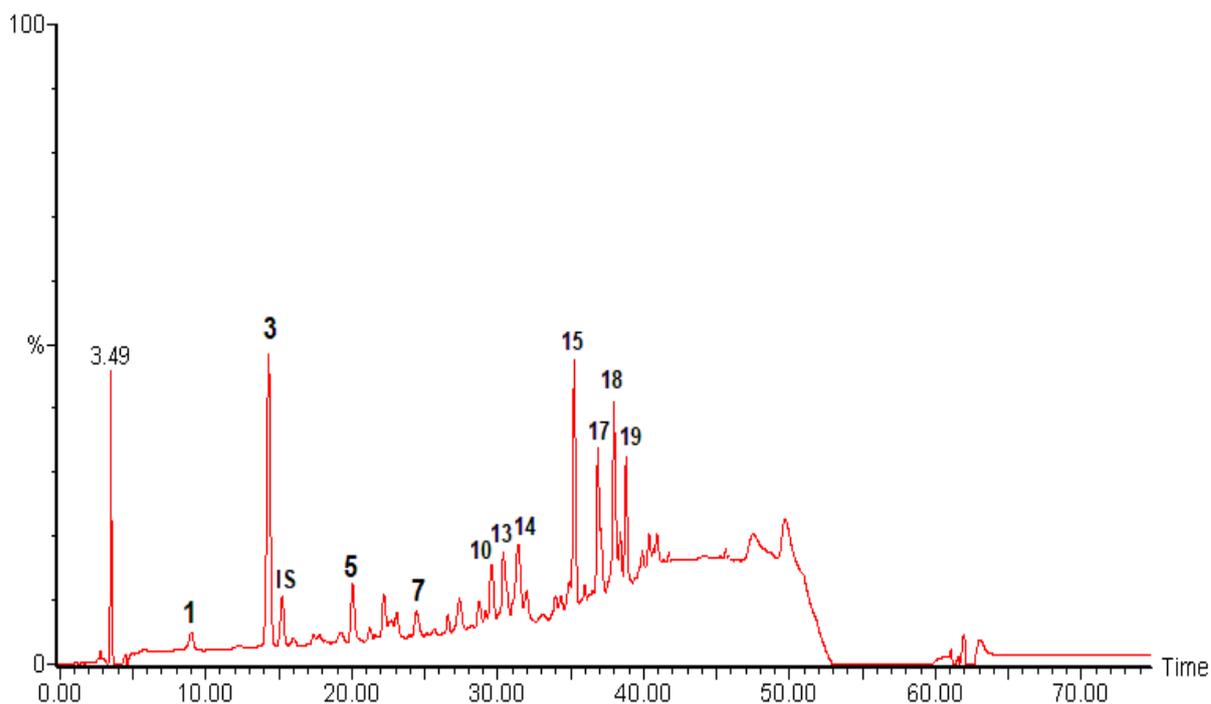
### III.10.1. Quantification des composés phénoliques

Le contenu en composés phénoliques identifiés dans les extraits EP, AcOEt, et *n*-BuOH obtenus des parties aériennes de la plante *E. altissima* sont résumés dans le **tableau 22**.

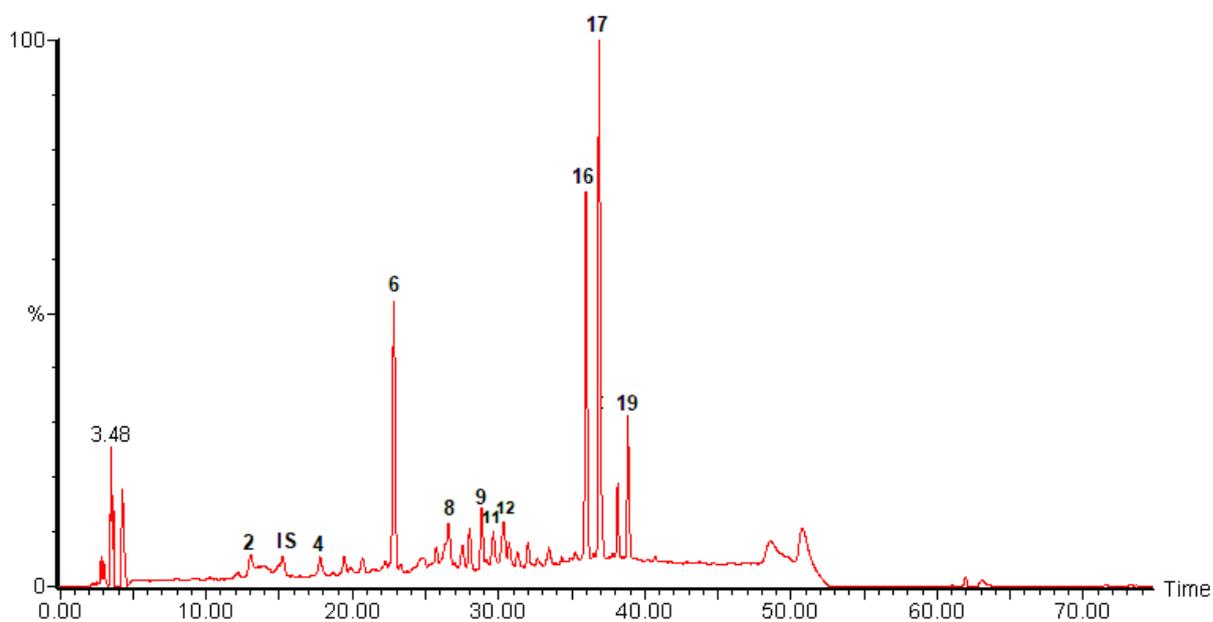
La quantification des composés phénoliques par LC-DAD-ESI/MSn indique que l'extrait *n*-BuOH présente la plus forte teneur en composés phénoliques (123,1 mg/g) suivi par l'extrait AcOEt (68,7 mg/g), par ailleurs, aucun composé phénolique n'a été détecté dans l'extrait EP. La teneur totale en composés phénoliques correspondant à la somme des composés phénoliques obtenus à partir des trois extraits (191,8 mg/g) est inférieure à la teneur en composés phénoliques des extraits éthanoliques des parties aériennes d'*E. alata* (240 mg/g) dont la quantification a été également faite par LC-DAD-ESI/MSn (Ziani *et al.*, 2019).

Dans l'extrait *n*-BuOH, l'isovitexine 2-rhamnoside est le composé majoritaire et représente 34% du total des composés phénoliques, suivi de la biochanine A *O*-hexoside-*O*-hexoside (22%) et de la vicénine II (20%). Pour les autres composés phénoliques, l'extrait *n*-BuOH contient entre 1% et 8% du total des composés phénoliques.

Cependant, le kaempférol-3-rhamnoside est le composé prédominant dans l'extrait AcOEt avec une concentration de 22% du total des composés phénoliques suivi de l'acide protocatéchique, biochanine A-*O*-hexoside et de la quercétine-3-rhamnoside avec des concentrations de 17,16 et 10% respectivement. Isovitexine-2-*O*-rhamnoside (7%), acide férulique (7%), acide gallique (6%), acide *p*-hydroxybenzoïque (5%), acide coumarique (4%), vitexine (4%) et *p*-hydroxybenzaldehyde (3%) sont présents dans la fraction d'acétate d'éthyle en petites quantités.



**Figure 43:** Profil chromatographique (DAD) de l'extrait acétate d'éthyle obtenu par LC-DAD-ESI/MS



**Figure 44 :** Profil chromatographique (DAD) de l'extrait *n*-BuOH obtenu par LC-DAD-ESI/MS

Tableau 21 : les composés phénoliques identifiés dans la plante *E. altissima*

Pics	Composé	t <sub>R</sub> (min)	[M-H] <sup>-</sup>	λ <sub>max</sub> (nm)	[M-H] <sup>-</sup> Fragments m/z
1	Acide gallique	9,03	169	271	169, 125
2	Acide protocatéchique glucoside	13,13	315	259,294	315, 153, 109
3	Acide protocatéchique	14,31	153	259,294	153, 109
4	Acide férulique glucoside	17,79	355	223	355, 193
5	Acide p-hydroxybenzoïque	20,06	137	254	137, 117, 108
6	Apigénine 6,8-di-C- glucoside (Vicénine II)	22,81	593	271,335	593,575, 503, 473, 383,353
7	P-hydroxybenzaldhyde	24,44	121	283	121, 117
8	Lutéoline-6-C-glucoside (isoorientine)	26,58	447	269,347	447, 429
9	Apigénine-6-C-pentoside-8- C-hexoside (di-C-glycoside)	28,83	563	270,336	563, 503, 473, 353, 443
10	Acide coumarique	29,59	163	308	163, 119
11	lutéoline 6-C-hexoside-O- hexoside	29,64	609	264,340	609, 447, 327
12	Vitexine 2''-O-glucoside	30,34	593	267, 336	593, 431, 311, 353, 383
13	Vitexine	30,39	431	370,336	431, 311
14	Acide férulique	31,41	193	323	193
15	Quercétine-3-rhamnoside	35,24	447	255,347	447, 447, 301
16	Biochanine A O-hexoside- O-hexoside	35,96	607	271,334	607, 445, 383
17	Isovitexine-2-O-rhamnoside	36,88	577	273,331	577, 341, 322, 293
18	K-3-O-rhamnoside	37,96	431	264,346	431, 285
19	Biochanine A-O-hexoside	38,84	721	271,332	445, 283

**Tableau 22:** Teneur en composés phénoliques dans les extraits obtenus de la plante *Ephedra altissima*

Composés phénoliques	Contenu mg/g			
	acétate d'éthyle	Ether de pétrole	<i>n</i> -butanol	Contenu totale
Acide gallique	3,9±0,1 6%	ND	ND	3,9±0,1
Acide protocatéchique glucoside	ND	ND	2,8±0,4 2%	2,8±0,4
Acide protocatéchique	11,8±0,1 17%	ND	ND	11,8±0,1
Acide férulique glucoside	ND	ND	1,7±0,1 1%	1,7±0,1
Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	3,5±0,2 5%	ND	ND	3,5±0,2
Vicenine II	ND	Trace	24,4±0,1 20%	24,4±0,1
<i>P</i> -hydroxybenzaldhyde	2,1±0,1 3%	ND	ND	2,1±0,1
Luteoline-6- <i>C</i> -glucoside (Isoorientine)	ND	ND	4,4±0,2 4%	4,4±0,2
Apigénine-6- <i>C</i> -pentoside-8- <i>C</i> -hexoside (di- <i>C</i> -glycoside)	ND	ND	3,4±0,1 3%	3,4±0,1
Acide Coumarique	2,7±0,2 4%	ND	ND	2,7±0,2
lutéoline 6- <i>C</i> -hexoside- <i>O</i> -hexoside	ND	ND	3,6±0,4 3%	3,6±0,4
Vitexine glucoside	ND	ND	4,3±0,2 3%	4,3±0,2
Vitexine	2,5±0,2 4%	ND	ND	2,5±0,2
Acide férulique	4,6±0,1 7%	ND	ND	4,6±0,1
Quercétine-3-rhamnoside	6,8±0,4 10%	ND	ND	6,8±0,4
Biochanine A <i>O</i> -hexoside- <i>O</i> -hexoside	ND	ND	27,6±0,1 22%	27,6±0,1
Isovitexine-2- <i>O</i> -rhamnoside	5,1±0,2 7%	ND	41,6±0,2 34%	46,7±0,8
K-3-rhamnoside	14,8±0,4 22%	ND	ND	14,8±0,4
Biochanine A- <i>O</i> -hexoside	11,0±0,3 16%	ND	9,4±0,1 8%	20,4±0,5
<b>Composés phénoliques totaux</b>	68,7±1,6a	-	123,1±0,9b	191,8±3,2

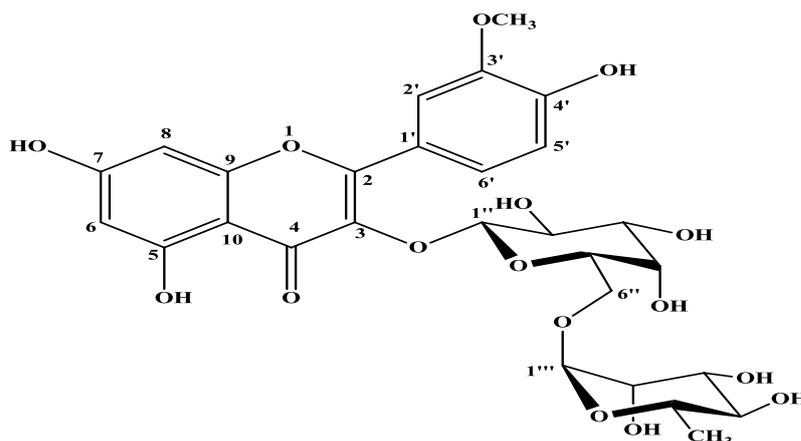
Les résultats correspondent à la moyenne ± SD de trois répétitions. Les lettres différentes dans la même ligne signifient qu'il existe des différences significatives ( $P < 0,05$ ). ND: non détecté

### III.11. Identification structurale des composés isolés

Les produits isolés ont été caractérisés par différentes méthodes spectroscopiques RMN 1D du proton et du carbone 13, RMN 2D (COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , HSQC DEPT 135, HMBC et TOCSY), spectrométrie de masse ESI-MS, UV-Vis, ainsi que par comparaison avec les données de la littérature.

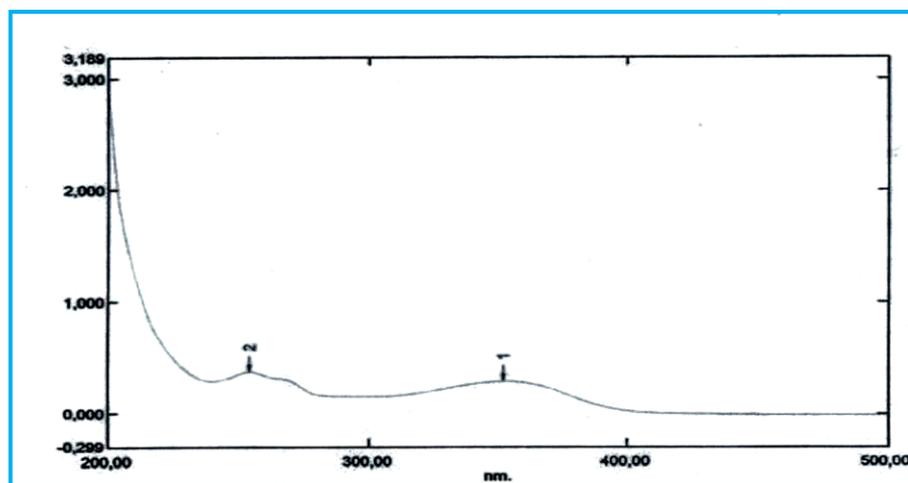
#### III.11.1. Identification structurale du composé A

Le composé **A** est obtenu sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. Il montre une tâche visible sous la lampe UV à 254 et 365 nm et se colore en jaune après révélation de sa CCM par une solution d'acide ( $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$ ) et chauffage à 100 °C.



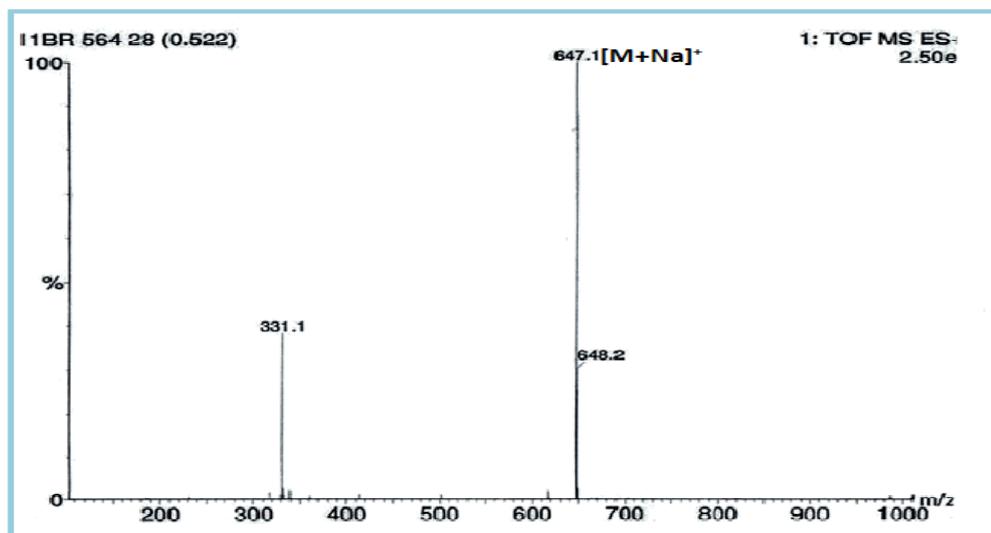
#### Isorhamnétine 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1'''-6'')- $\beta$ -D-galactopyranoside

Le spectre UV-Vis enregistré dans le méthanol de ce composé (**Figure 45**) montre la présence de deux bandes d'absorption à 358 nm (Bande I) et 260 nm (Bande II) caractérisant la présence d'un flavonoïde de type flavonol substitué en position C-3 (C-OR) (**Tiberti *et al.*, 2007**).



**Figure 45:** Spectre UV-Vis du composé A

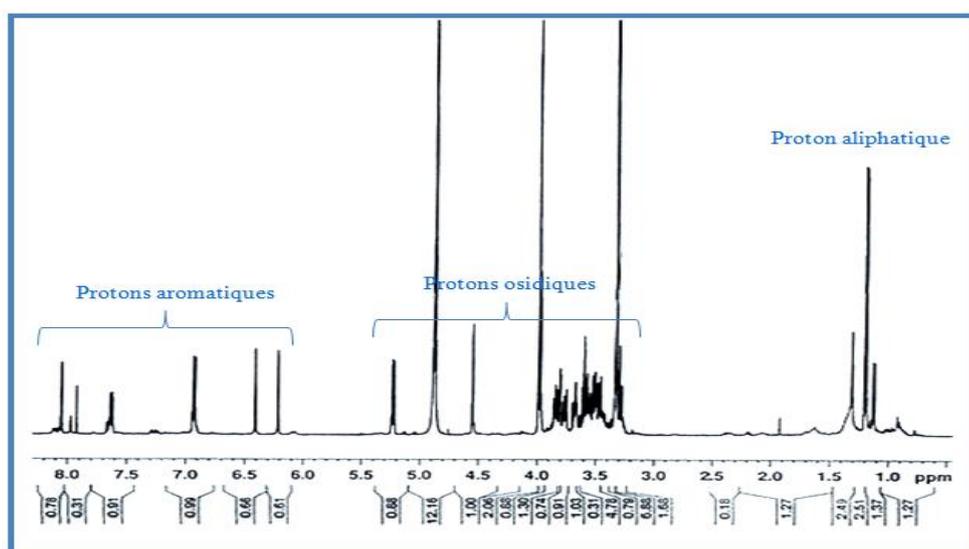
Le spectre de masse enregistré en mode positif du composé A (**Figure 46**) révèle la présence d'un pic d'ion pseudomoléculaire à  $m/z = 647,1$   $[M+Na]^+$ . Ceci correspond à une masse moléculaire égale à 624 uma et une formule brute en  $C_{28}H_{32}O_{16}$  avec un nombre d'insaturation égale à 13.



**Figure 46:** Spectre de masse ESI-MS en mode positif du composé A

L'analyse du spectre RMN<sup>1</sup>H (**Figure 47**) du composé A, enregistré dans MeOH-*d*<sub>4</sub> montre:

- Des signaux entre 6,2-8,1 ppm caractéristiques de protons aromatiques.
- Un ensemble des signaux entre 3,2-5,3 ppm incluant deux signaux doublets de deux protons anomères résonant à  $\delta_H$  5,23 (1H,  $J=7,8$  Hz) et 4,55 (1H,  $J=1,1$  Hz) indiquant la présence de deux unités osidiques. Ce spectre met aussi en évidence la présence de trois protons aliphatiques repérés à 1,2 ppm.



**Figure 47 :** spectre RMN <sup>1</sup>H du composé A

### Identification de la partie aglycone

L'analyse conjointe des spectres RMN  $^1\text{H}$  (Figure 48) et COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Figure 49) permet de constater la présence de :

- Deux signaux à  $\delta_{\text{H}}$  6,2 et 6,41 d'intégration 1H, sous forme de doublet chacun avec une valeur de constante de couplage ( $J = 2$  Hz) traduisant un couplage de type méta.

Selon le spectre COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ces deux protons appartiennent à un même système de spins, correspondant aux protons H-6 et H-8 du cycle A du flavonol.

- Le spectre COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  de ce composé montre également la présence d'un système de spins à trois protons à  $\delta_{\text{H}}$  8,05 (1H, *d*,  $J = 2$  Hz), 7,62 (1H, *dd*,  $J = 8,4; 2$  Hz) et 6,93 (1H, *d*,  $J = 8,4$  Hz), dont les valeurs des déplacements chimiques et des constantes de couplage attestent qu'ils forment un système ABX d'un noyau aromatique 1',3',4'-trisubstitué, qui est le cycle B du flavonol. Ces protons sont respectivement attribués à H-2', H-6' et H-5' (Figure 49).
- Un signal résonant à  $\delta_{\text{H}}$  4,0 (3H, *s*) attribuable aux protons d'un groupement méthoxy.

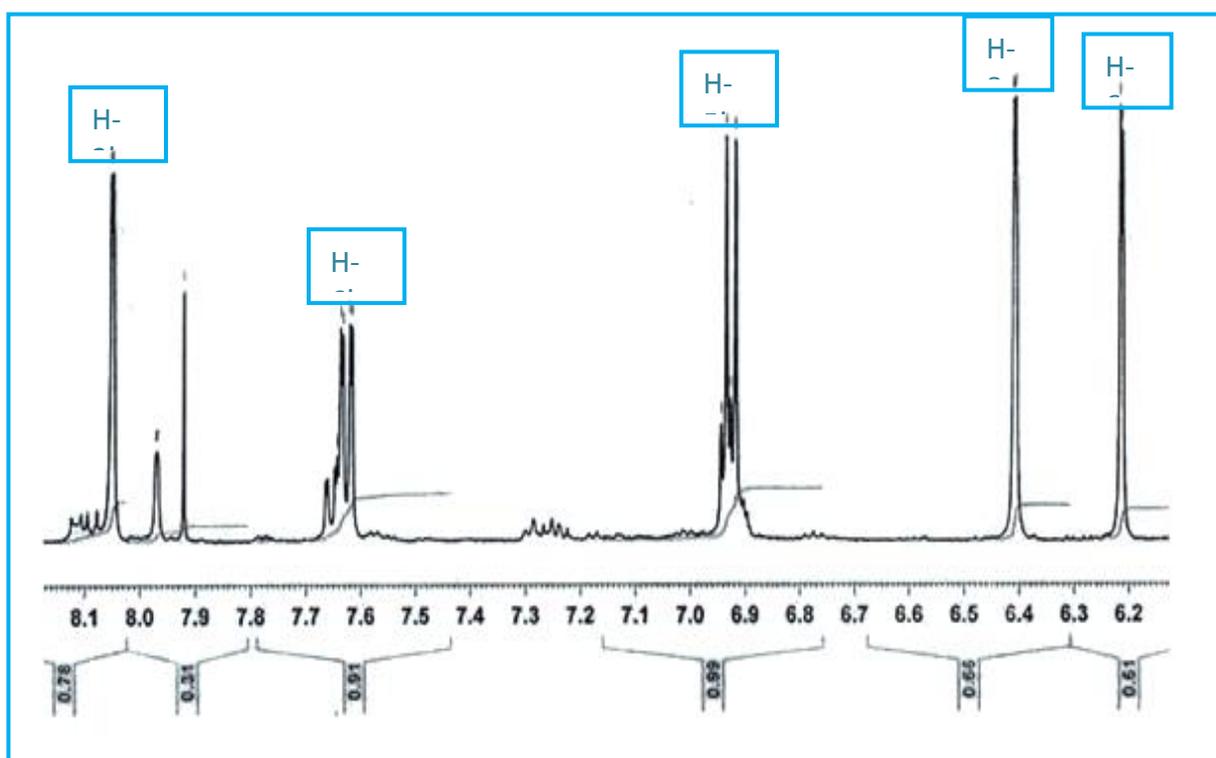
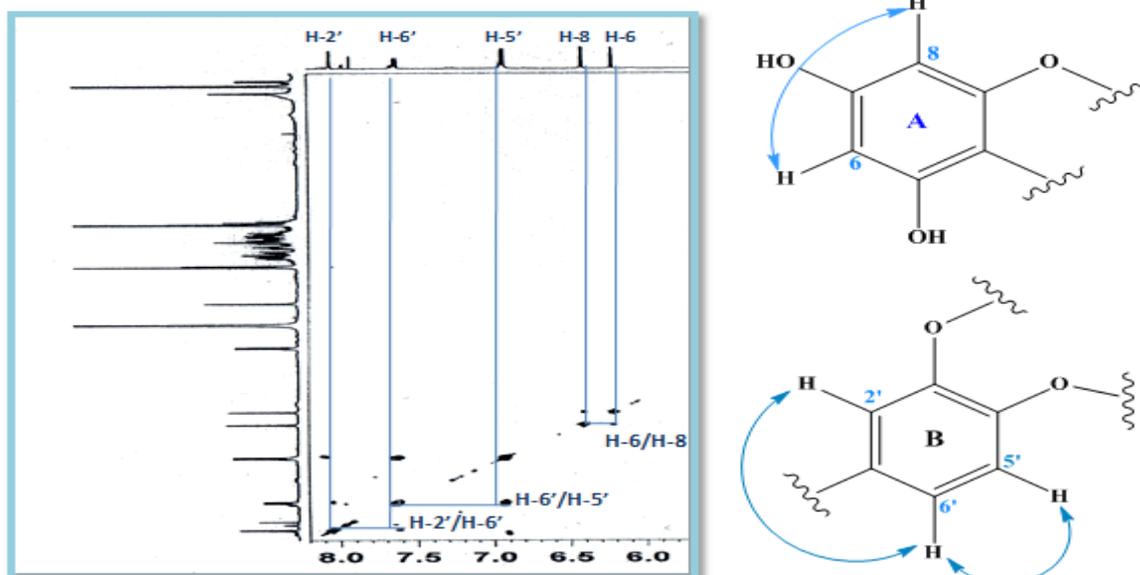


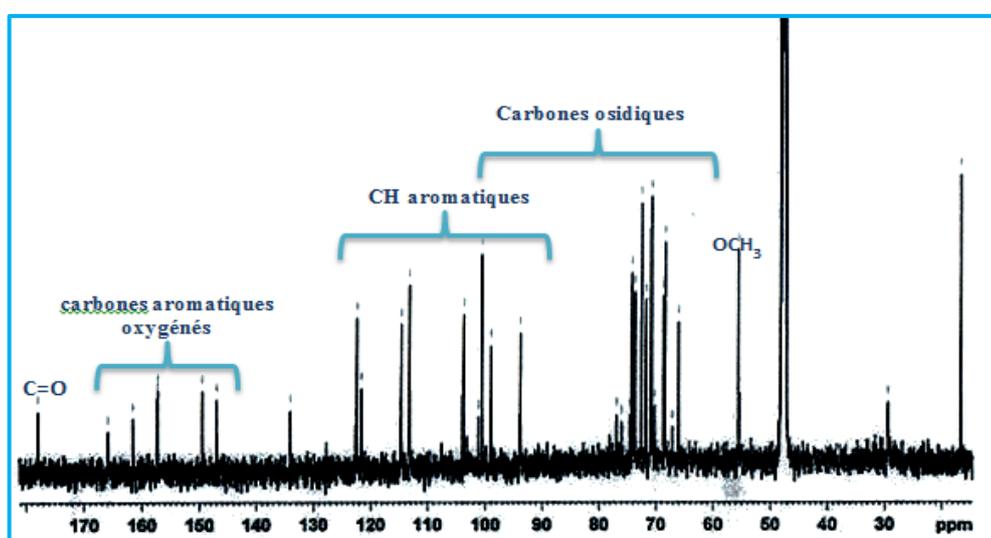
Figure 48 : Etallement de la région aromatique du composé A



**Figure 49:** Partie du spectre COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  du composé A

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé A (**Figure 50**), permet de compter 28 signaux correspondant à 28 atomes de carbone qui sont répartis comme suit:

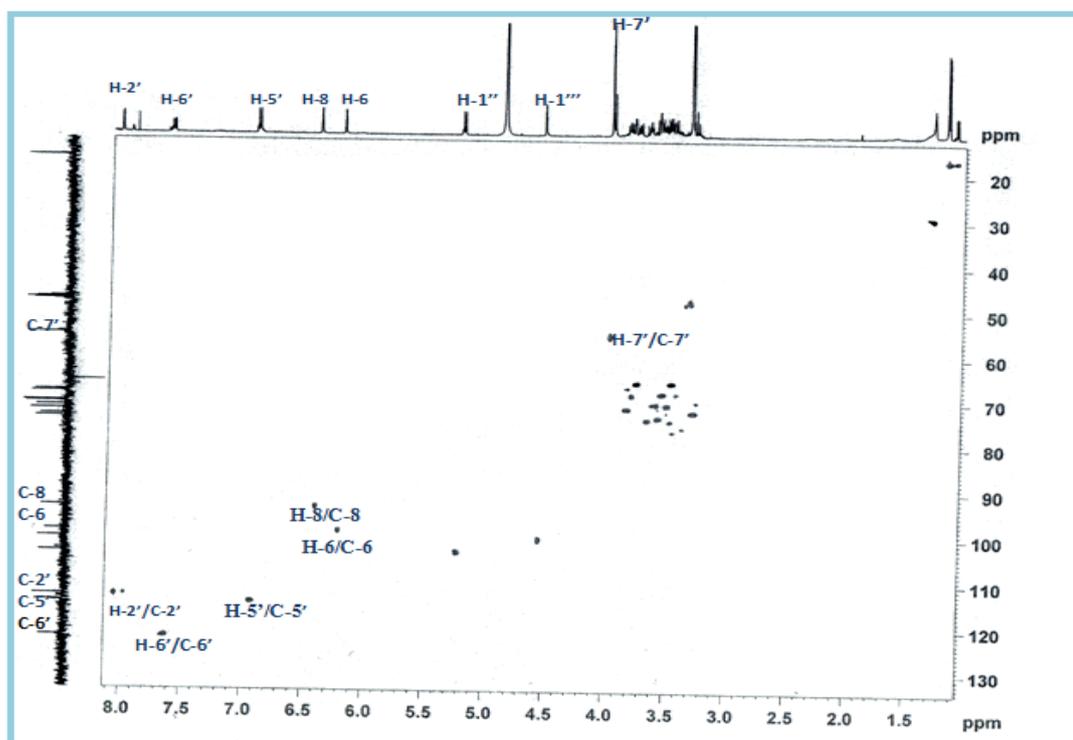
- Un carbonyle à  $\delta_{\text{C}}$  177,9 correspondant au carbone C-4.
- Sept carbones aromatiques oxygénés résonant entre 147 et 165,9 ppm.
- Cinq CH aromatiques entre 93,7 et 122,5 ppm.
- Plusieurs CH résonant entre 66 et 103,6 ppm attribuables aux carbones de deux unités osidiques.
- Un groupement méthoxyle ( $\text{OCH}_3$ ) à  $\delta_{\text{C}}$  55,5.
- Un groupement méthyle à 16,6 ppm.



**Figure 50 :** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé A

L'analyse combinée des spectres HSQC (**Figure 51**) et HMBC (**Figure 52**) a permis l'élaboration de la structure des parties suivantes :

- Les protons H-6 et H-8 du cycle A déjà identifiés couplent en HSQC avec leurs carbones à  $\delta_c$  98,9 et 93,7. Ces deux protons corrélient sur le spectre HMBC en  $^2J$  avec un carbone aromatique oxygéné à  $\delta_c$  165,9 (C-7) et en  $^3J$  avec un carbone aromatique quaternaire à  $\delta_c$  103,6 (C-10).



**Figure 51** : Spectre HSQC de la partie aglycone du composé A

- Les carbones C-5 ( $\delta_c$  161,5) et C-9 ( $\delta_c$  157,2) sont identifiés suite aux corrélations qu'ils présentent en  $^2J$  avec les protons H-6 et H-8 respectivement.
- Les deux protons aromatiques H-2' et H-6' du cycle B corrélient en HSQC avec leurs carbones résonants à  $\delta_c$  113,2 (C-2') et 122,3 (C-6'). Ils couplent en HMBC en  $^3J$  avec le carbone quaternaire oxygéné C-2 ( $\delta_c$  157,3), son déplacement chimique confirme que le composé **A** est un flavonol substitué en C-3.
- Les protons H-2' et H-5' corrélient en HMBC en  $^2J$  avec deux carbones quaternaires à  $\delta_c$  122,5 et 149,5 attribuables aux carbones C-1' et C-4' respectivement. Le déplacement chimique du carbone C-5' ( $\delta_c$  114,6) est déterminé par expérience HSQC.
- Le déplacement chimique du carbone C-4 est localisé à  $\delta_c$  177,9.
- Le déplacement chimique à  $\delta_c$  135 est attribuable à priori au carbone C-3.

Le carbone aromatique du cycle B porteur du groupement méthoxyle ( $\delta_H$  4,0 /  $\delta_C$  55,5) est assigné à  $\delta_C$  147 (C-3') suite aux corrélations observées en  $^2J$  avec H-2' et en  $^3J$  avec H-5' (Figure 53). L'absence d'une corrélation entre H-6' et le carbone substitué par le groupement méthoxyle implique qu'il s'agit du carbone C-3'. Ceci indique que le OH en position C-4' est libre.

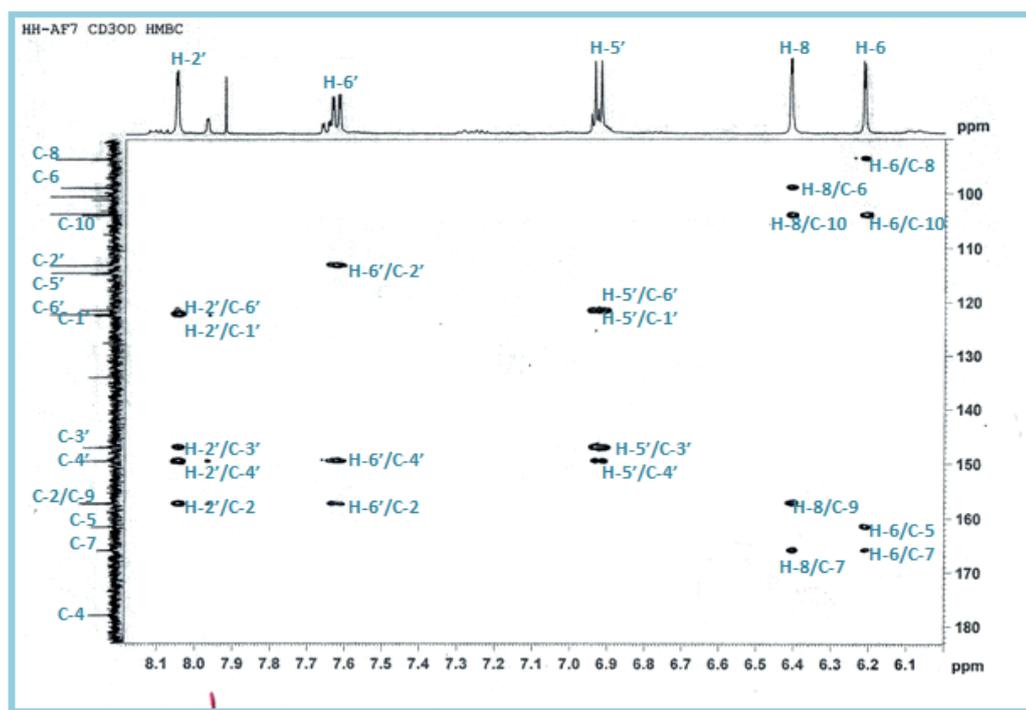


Figure 52 : Spectre HMBC de la partie aglycone du composé A

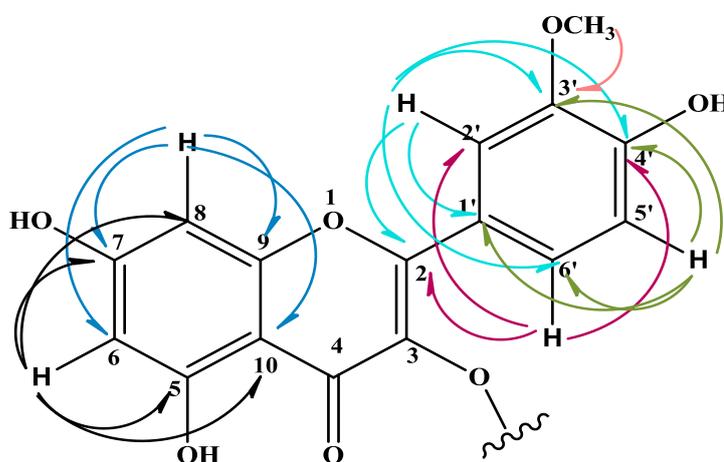


Figure 53 : Corrélations HMBC de la partie aglycone du composé A

A ce stade d'analyse, tous les protons et carbones des cycles A, B et C sont caractérisés. La partie aglycone du flavonol est alors identifiée à l'isorhamnétine (Cao *et al.*, 2009) (Figure 54).

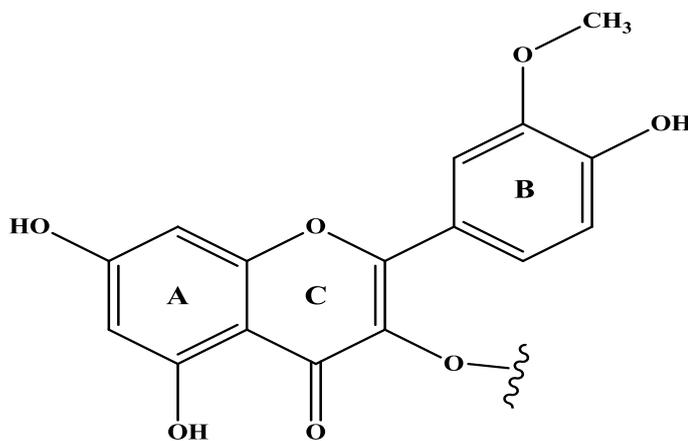


Figure 54 : Squelette isorhamnnetine du composé A

### Identification de la partie osidique

L'analyse du spectre RMN  $^1\text{H}$  montre l'existence de deux unités osidiques par la mise en évidence de deux signaux de protons anomères à  $\delta_{\text{H}}$  5,23 ( $d$ ,  $J = 7,8$  Hz, H-1'') et 4,55 ( $d$ ,  $J = 1,1$  Hz, H-1'''). Leurs carbones sont repérés à  $\delta_{\text{C}}$  103,6 (C-1'') et 100,5 (C-1''') par l'expérience HSQC (Figure 55).

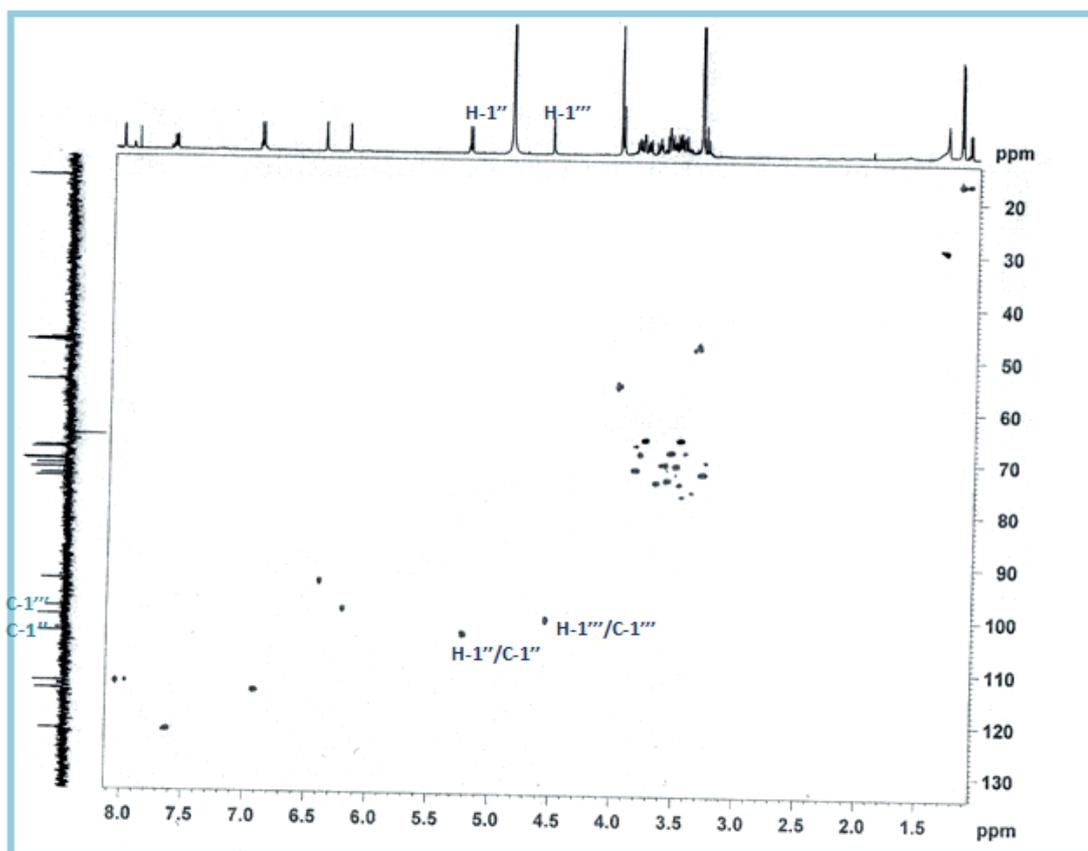
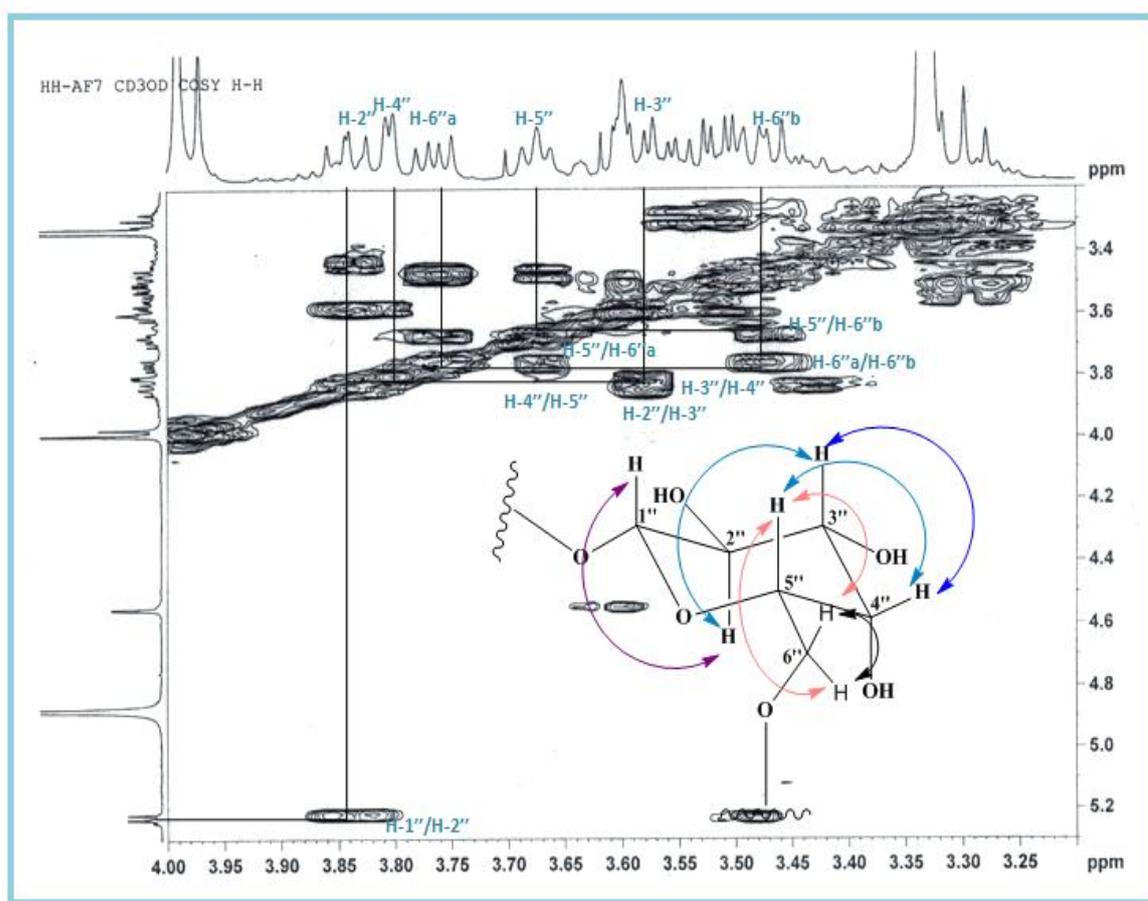


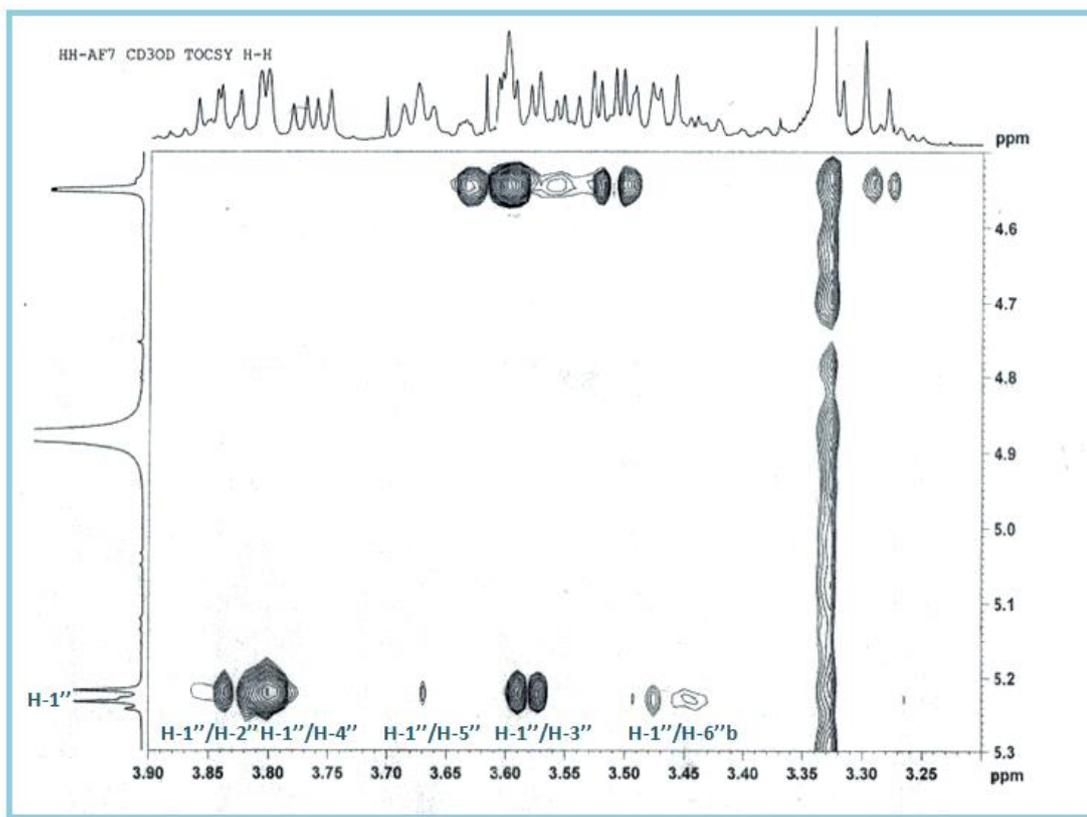
Figure 55 : Spectre HSQC des protons anomères du composé A

A partir du proton anomère H-1'' ( $\delta_H$  5,23), l'analyse des spectres COSY  $^1H$ - $^1H$  (**Figure 56**) et TOCSY (**Figure 57**) permet d'identifier un galactose de configuration  $\beta$  ( $J = 7,8$  Hz entre H-1'' et H-2''), et cela à travers les couplages suivants :

- H-1''/H-2'' ( $\delta_H$  3,85 ; *dd* ;  $J = 9,4$  ; 7,8 Hz ; H-2'').
- H-2''/H-3'' ( $\delta_H$  3,59 ; *dd* ;  $J = 9,4$  ; 3,2 Hz ; H-3'').
- H-3''/H-4'' ( $\delta_H$  3,81 ; *dl* ;  $J = 3,2$  Hz ; H-4'').
- H-4''/H-5'' ( $\delta_H$  3,68 ; *tl* ;  $J = 6,2$  Hz ; H-5'').
- H-5''/H<sub>2</sub>-6'' ( $\delta_H$  3,76 ; *dd* ;  $J = 10,2$  ; 5,5 Hz ; H-6''a) / ( $\delta_H$  3,47 ; *dd* ;  $J = 10,2$  ; 6,2 Hz ; H-6''b).

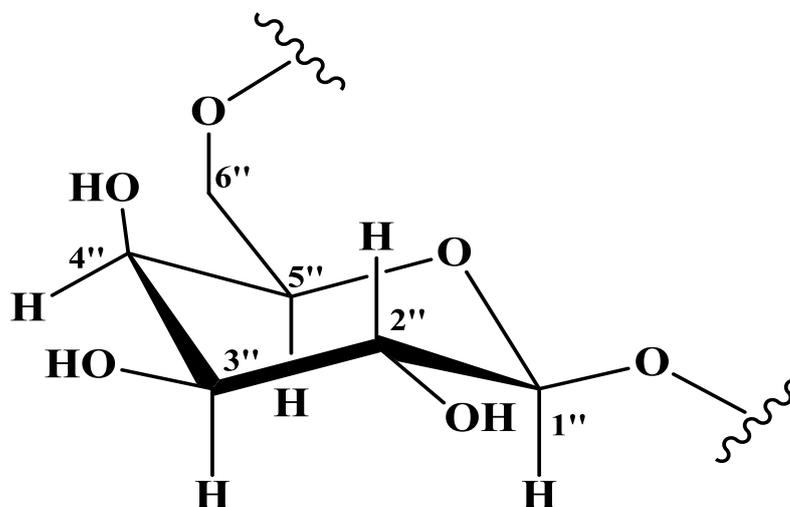


**Figure 56** : Spectre COSY  $^1H$ - $^1H$  de la partie osidique (galactose) du composé A



**Figure 57 :** Spectre TOCSY de la partie osidique (galactose) du composé A

La multiplicité du proton H-4'' sous forme d'un doublet large avec une petite constante de couplage entre les deux protons H-4'' et H-3'' ( $J = 3,2$  Hz) suggère la position équatoriale du proton H-4''. Le déblindage du carbone C-6'' de ce galactose établi à  $\delta_C$  66 par HSQC est significatif d'une substitution en cette position par le second sucre.

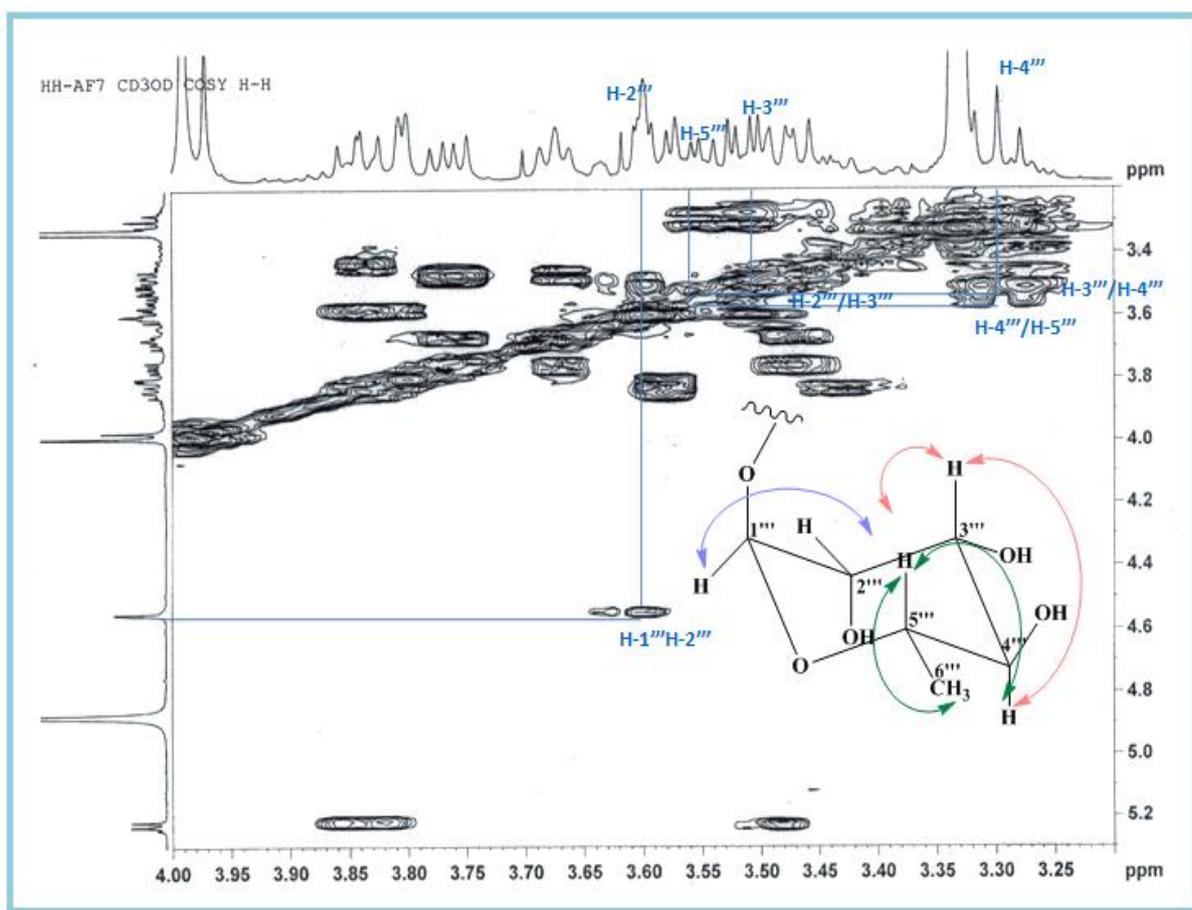


**Figure 58:** Structure du premier sucre identifiée  $\beta$ -D-galactose

En partant du 2<sup>ème</sup> proton anomérique H-1''' ( $\delta_H$  4,55), un autre système de spins est observé sur le spectre COSY  $^1H$ - $^1H$  (**figure 59**) suggérant la présence d'un groupement 6-désoxyhexose. Ce spectre montre les corrélations suivantes :

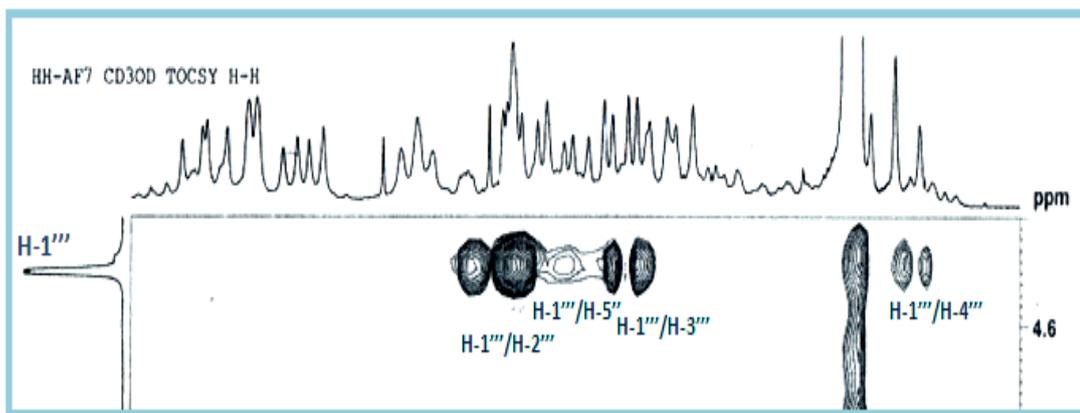
- H-1'''/H-2''' (3,62 ; *dd* (3,4; 1,1)).
- H-2'''/H-3''' ( $\delta_H$  3,52 ; *dd* ;  $J = 9,4$  ; 3,3Hz ; H-3''').
- H-3'''/H-4''' ( $\delta_H$  3,30 ; *t* ;  $J = 9,5$  Hz ; H-4''').
- H-4''' /H-5''' ( $\delta_H$  3,55 ; *m* ; H-5''').
- H<sub>3</sub>-5'''/H-6''' ( $\delta_H$  1,2 ; *d* ;  $J = 6,2$  Hz).

La grande valeur de la constante de couplage H-3'''/H-4'''  $J = 9,5$  Hz indique la position *trans*-diaxiale de ces protons, tandis que la valeur de la constante de couplage  $J = 3,3$  Hz entre H-2'''/H-3''' révèle la position équatoriale du proton H-2'''. Les constantes de couplage de ce 6-désoxyhexose indiquent qu'il s'agit d'un  $\alpha$ -L-rhamnose.



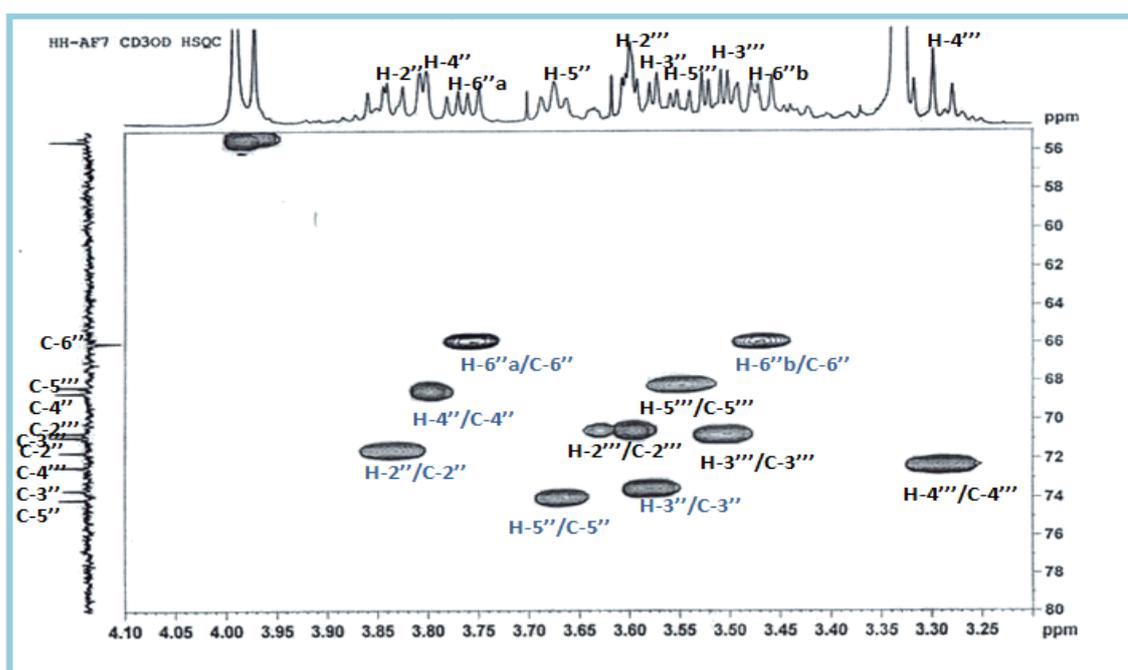
**Figure 59** : Spectre COSY  $^1H$ - $^1H$  de la partie osidique (rhamnose) du composé A

Les attributions faites par l'expérience COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  sont confirmées par l'analyse du spectre TOCSY (**Figure 60**).



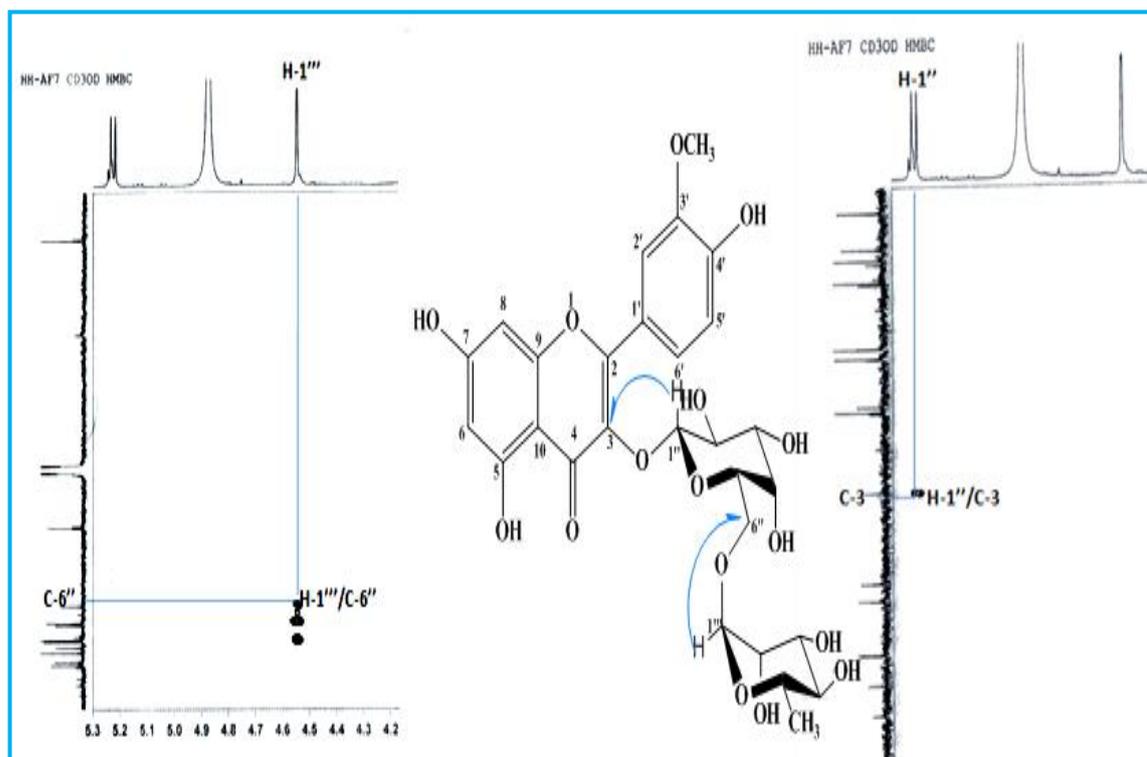
**Figure 60** : Spectre TOCSY de la partie osidique (rhamnose) du composé A

L'expérience HSQC (**Figure 61**) permet d'assigner tous les déplacements chimiques des carbones de ces deux sucres.



**Figure 61** : Spectre HSQC de la partie osidique du composé A

Les corrélations HMBC (**Figure 62**) du proton anomérique H-1'' du  $\beta$ -D-galactose avec le carbone C-3 d'une part, et d'autre part, le deuxième proton anomérique H-1''' du  $\alpha$ -L-rhamnose et le carbone C-6'' du galactose, permettent de constituer l'enchaînement entre les deux unités osidiques et l'aglycone.



**Figure 62** : Spectre HMBC de la partie osidique du composé A

L'ensemble des données spectrales (**Tableau 23**) établi par l'analyse RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, HMBC, COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H, TOCSY, HSQC ainsi que la comparaison avec les données de la littérature (**Kacem, 2016**), permettent d'identifier la structure du composé A à l'isorhamnétine 3-O- α-L-rhamnopyranosyl (1'''-6'')- β-D-galactopyranoside.

Ce composé appelé aussi isorhamnétine 3-O-robinobioside a été isolé antérieurement à partir des plantes *Nitraria retusa* (**Boubaker et al., 2012**), *Opuntia ficus-indica* (fleurs) (**De Leo et al., 2010**) et *Convolvulus tricolore* L. (écorces de graines) (**Kacem, 2016**). Il possède les activités biologiques à savoir :

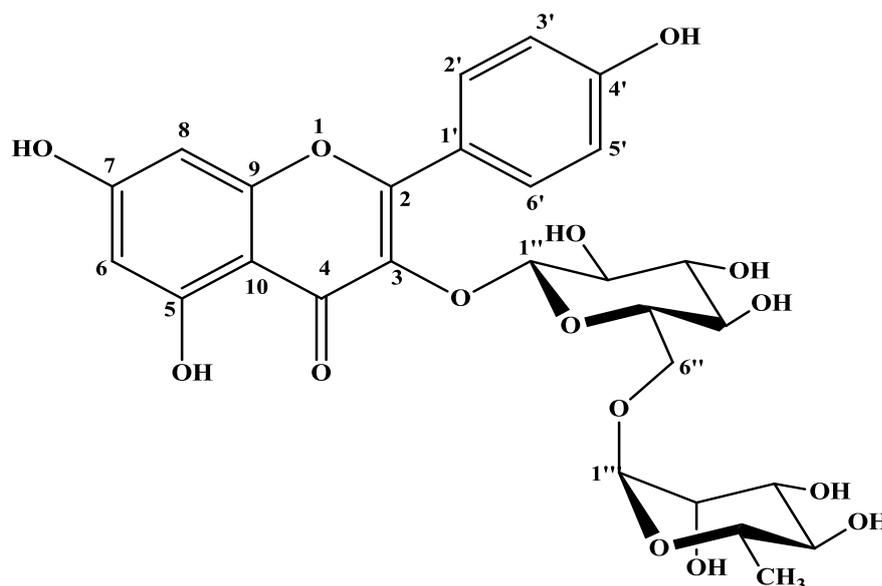
- Antioxydante (**Boubaker et al., 2012**).
- Antigénotoxique (**Boubaker et al., 2012**).
- Inhibiteur de la testostérone 5α -réductase (**De Leo et al., 2010**).

**Tableau 23:** Déplacements chimiques RMN<sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) du composé A dans le méthanol deutéré.

Position	$\delta_H$ (ppm) ; <i>m</i> ; J(Hz)	$\delta_C$ (ppm)
1	—	—
2	—	157,3
3	—	135
4	—	177,9
5	—	161,5
6	6,2 ; <i>d</i> (2)	98,9
7	—	165,9
8	6,41 ; <i>d</i> (2)	93,7
9	—	157,2
10	—	103,6
1'	—	122,5
2'	8,05 ; <i>d</i> (2)	113,2
3'	—	147,0
4'	—	149,5
5'	6,93 ; <i>d</i> (8.4)	114,6
6'	7,62 ; <i>dd</i> (8.4;2)	122,3
7'	4,0 ; <i>s</i>	55,5
<b>3-O- Gal</b>		
1''	5,23 ; <i>d</i> (7,8)	103,6
2''	3,85 ; <i>dd</i> (9,4;7,8)	71,7
3''	3,59 ; <i>dd</i> (9,4;3,5)	73,6
4''	3,81 ; <i>dl</i> (3,6)	68,6
5''	3,68 ; <i>tl</i> (6,2)	74,1
6''	H-6'' <sub>a</sub> 3,76 ; <i>dd</i> (10,2 ; 5,5)	66,0
	H-6'' <sub>b</sub> 3,47 ; <i>dd</i> (10,2; 6,2)	
<b>Rha-(1'''→6'')-Gal</b>		
1'''	4,55 ; <i>d</i> (1,1)	100,5
2'''	3,62 ; <i>dd</i> (3,4; 1,1)	70,7
3'''	3,52 ; <i>dd</i> (9,4 ; 3,4)	70,9
4'''	3,3 ; <i>t</i> (9,4)	72,4
5'''	3,55 ; <i>m</i> -	68,3
6'''	1,20 ; <i>d</i> (6,2)	16,6

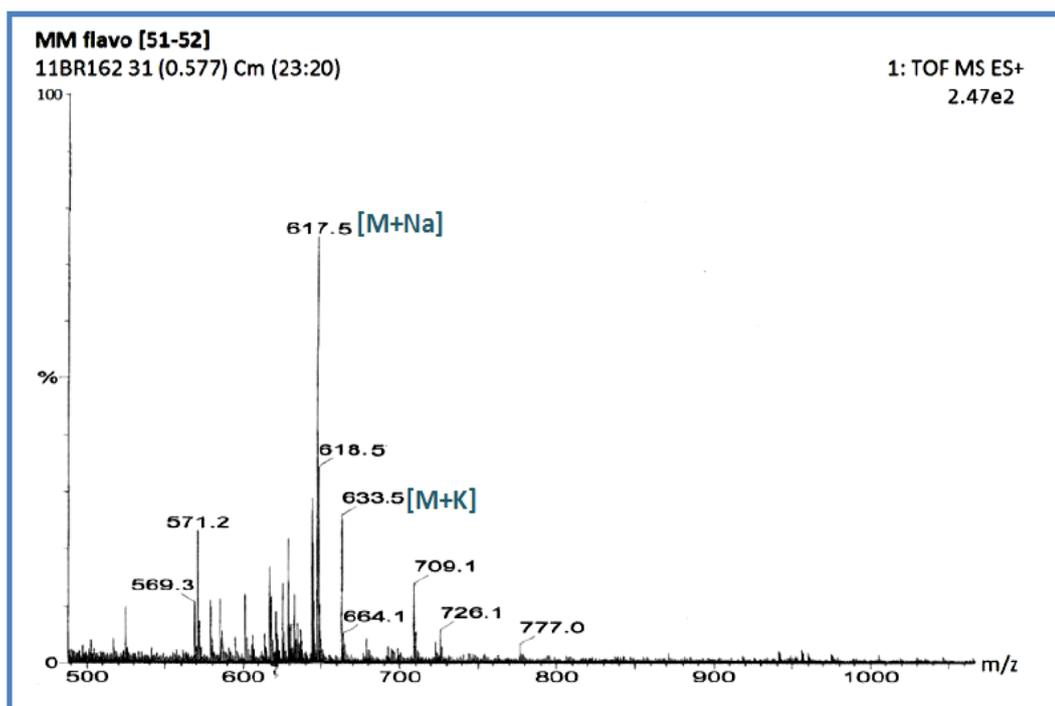
### III.11.2. Identification structurale du composé B

Le composé **B**, visible en UV (254 et 365 nm), se présente sous forme d'une poudre blanche soluble dans le méthanol. Sa coloration jaune, après révélation par H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/AcOH/H<sub>2</sub>O, traduit la nature flavonoïdique du composé.



### Kaempférol 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1'''-6'')- $\beta$ -D-glucopyranoside

Sur le spectre de masse ESI-MS (**Figure 63**) enregistré en mode positif, deux pics d'ions pseudomoléculaires sont observés à  $m/z = 617,5 [M+Na]^+$  et  $633,5 [M+K]^+$ , correspondant à une masse moléculaire égale à 594 uma et une formule brute en  $C_{27}H_{30}O_{15}$ , avec un nombre d'insaturation égale à 13.



**Figures 63:** Spectre de masse ESI (mode positif) du composé **B**

L'analyse des spectres RMN  $^1\text{H}$  (Figure 64), COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Figure 65) et RMN  $^{13}\text{C}$  (Figure 66) du composé **B** enregistrés dans DMSO- $d_6$ , montre une similitude structurale avec le composé **A** déjà identifié, au niveau des cycles A et C. En effet, le spectre RMN  $^1\text{H}$  montre les signaux des protons suivants :

- H-6 à  $\delta_{\text{H}}$  6,21 (1H ;  $d$  ;  $J = 1,8$  Hz).
- H-8 à  $\delta_{\text{H}}$  6,4 (1H ;  $d$  ;  $J = 1,8$  Hz).
- H-2' ; H-6' à  $\delta_{\text{H}}$  8,1 (2H ;  $d$  ;  $J = 8,8$  Hz).
- H-3' ; H-5' à  $\delta_{\text{H}}$  6,91 (2H ;  $d$  ;  $J = 8,8$  Hz).

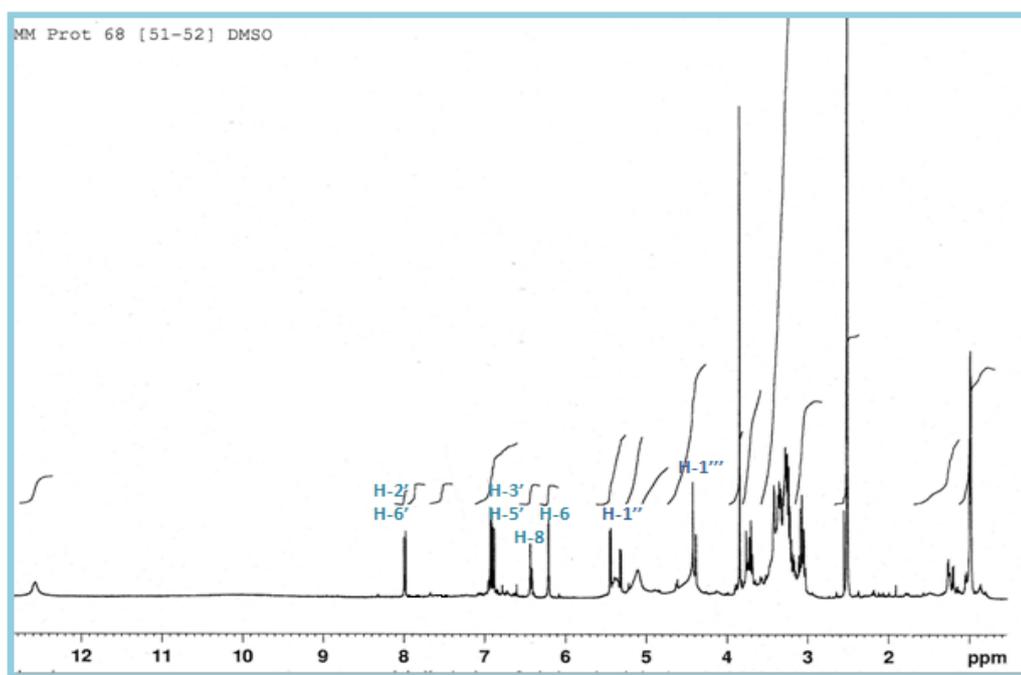


Figure 64: Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **B**

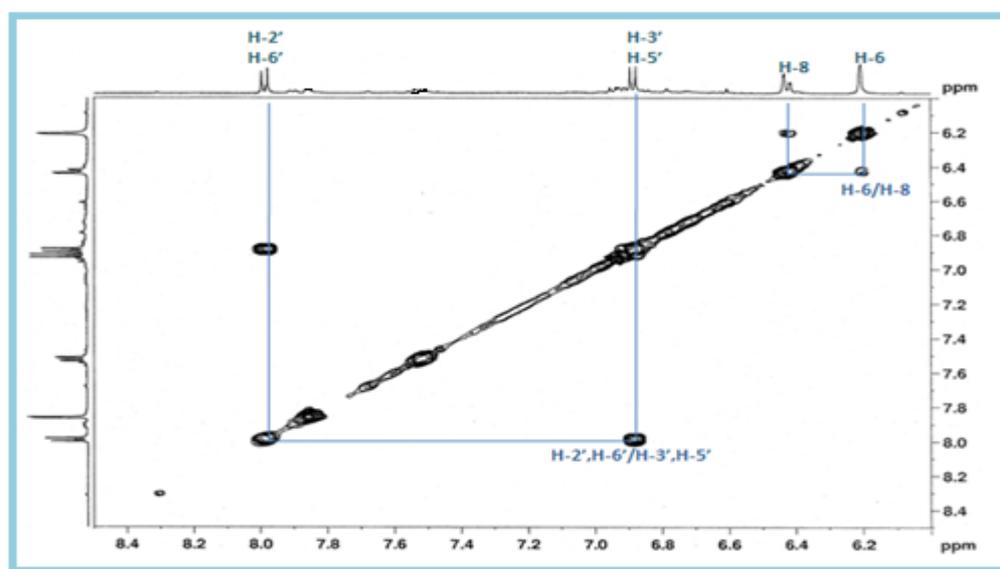
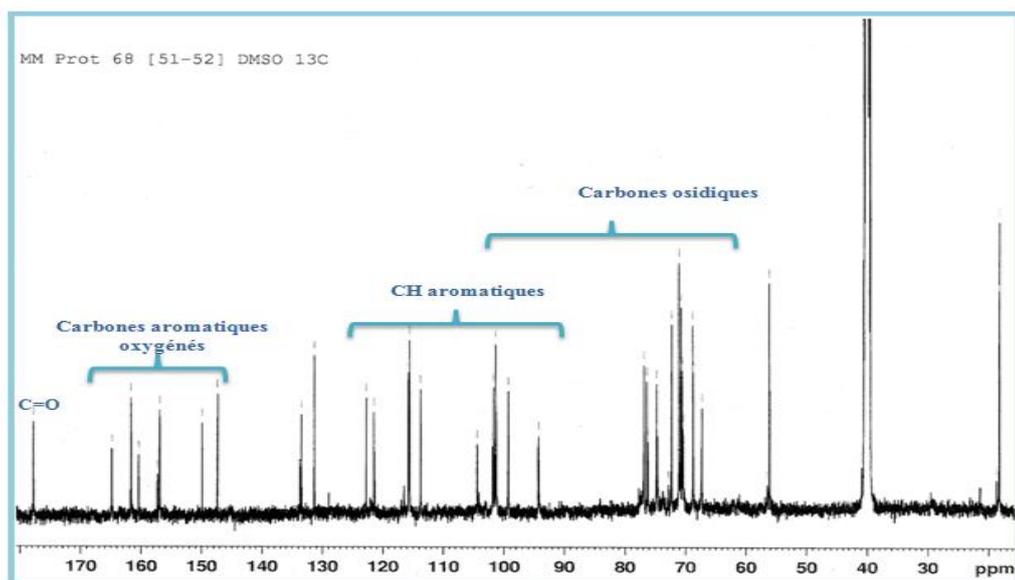


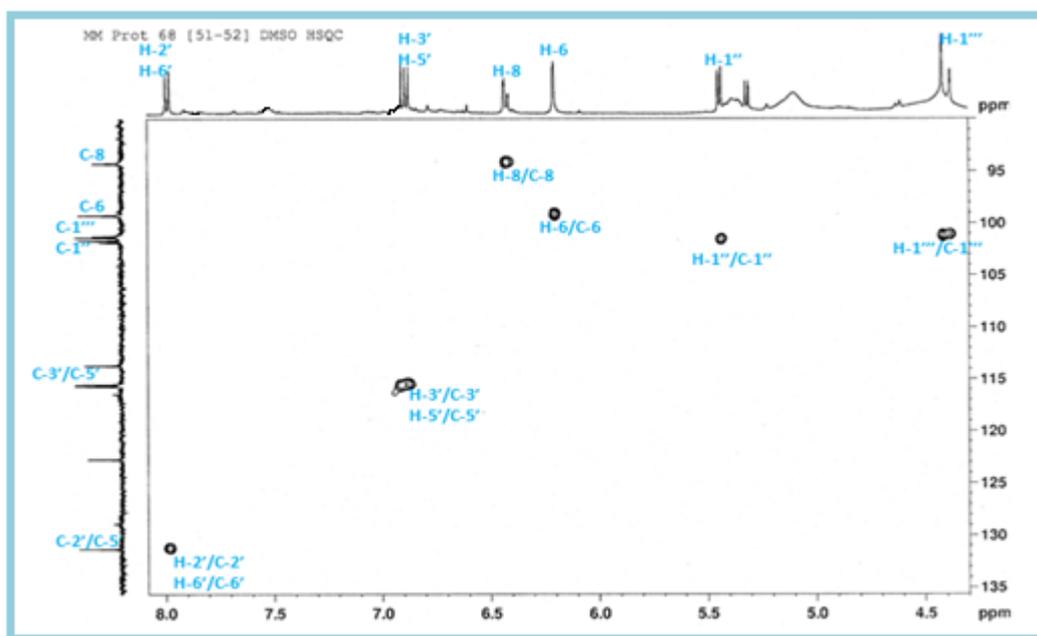
Figure 65 : Spectre COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  de la génine du composé **B**



**Figure 66** : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé **B**

Par ailleurs, l'observation de plusieurs signaux dans l'intervalle [3→5,5] ppm ainsi que deux signaux d'intégration 1H chacun à  $\delta_{\text{H}}$  5,45 ( $d$ ;  $J = 7,4$  Hz) et 4,59 ( $d$ ;  $J = 1,3$ ) établit l'existence de deux unités osidiques. La présence d'un groupement méthyle observé sur la partie blindée du spectre RMN  $^1\text{H}$  suggère clairement qu'une des deux unités osidiques est un 6-déoxyhexose.

Parallèlement, l'analyse du spectre HSQC permet d'identifier les carbones des protons cités précédemment (**Figure 67**). Ces derniers sont repérés à  $\delta_{\text{C}}$  99,2 (C-6), 94,3 (C-8), 131,3 (C-2', C-6'), 115,5 (C-3', C-5'), 101,6 (C-1'') et 100,3 (C-1''').



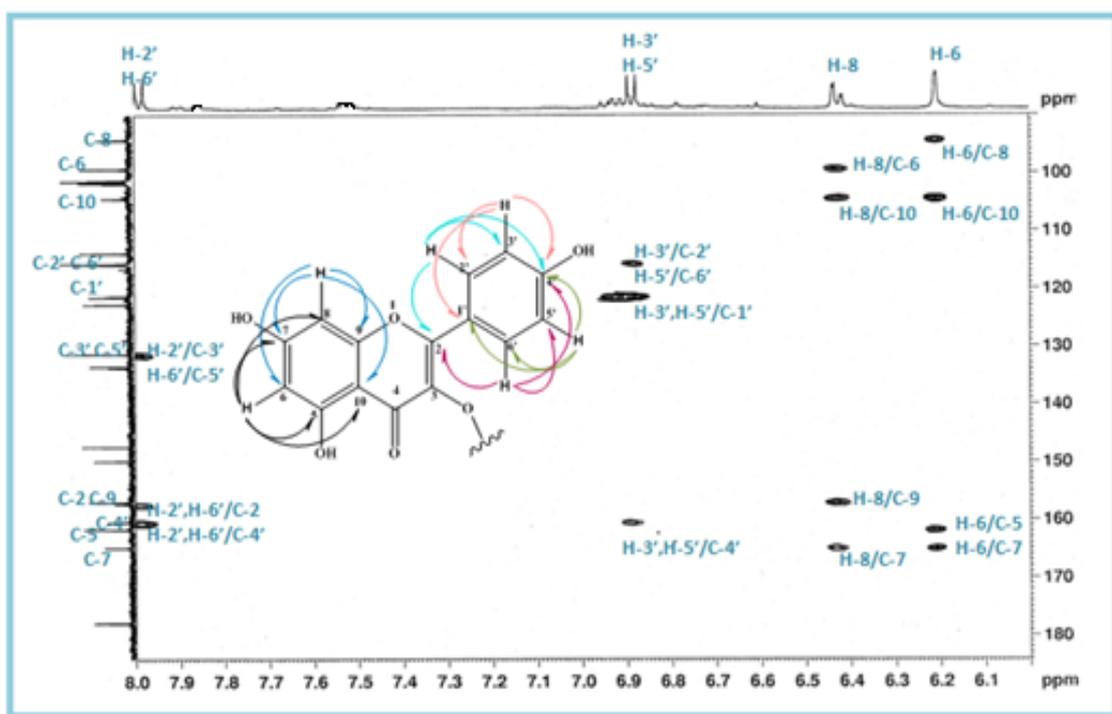
**Figure 67** : Spectre HSQC de la partie aglycone du composé **B**

A l'issue de cette première analyse, le composé **B** est un flavonol de type kaempférol porteur de deux unités osidiques.

### Identification de la partie aglycone

L'identification de la génine à un kaempférol glycosylé en C-3, est confirmée suite à l'analyse du spectre HMBC (**Figure 68**) qui montre les corrélations entre :

- Les protons H-2'/H-6' du cycle B et quatre carbones quaternaires résonant à  $\delta_C$  115,5 (C-3'/C-5'), 160,4 (C-4' ; oxygéné), 156,8 (C-2 ; oxygéné).
- Les protons H-3'/H-5' du cycle B et quatre carbones quaternaires localisés à  $\delta_C$  121,5; 131,3 et 160,4 attribuables respectivement aux carbones C-1', (C-2'/ C-6') et C-4'.
- Le proton H-8 et quatre carbones quaternaires à  $\delta_C$  99,2 (C-6), 104,4 (C-10), 156,9 (C-9 ; oxygéné) et 164,8 (C-7 ; oxygéné).
- Le proton H-6 et trois carbones quaternaires résonant à  $\delta_C$  94,3 (C-8), 104,4 (C-10) et 164,8 (C-7) oxygéné, et un autre carbone quaternaire oxygéné qui ne peut être que le C-5 (161,6 ppm).



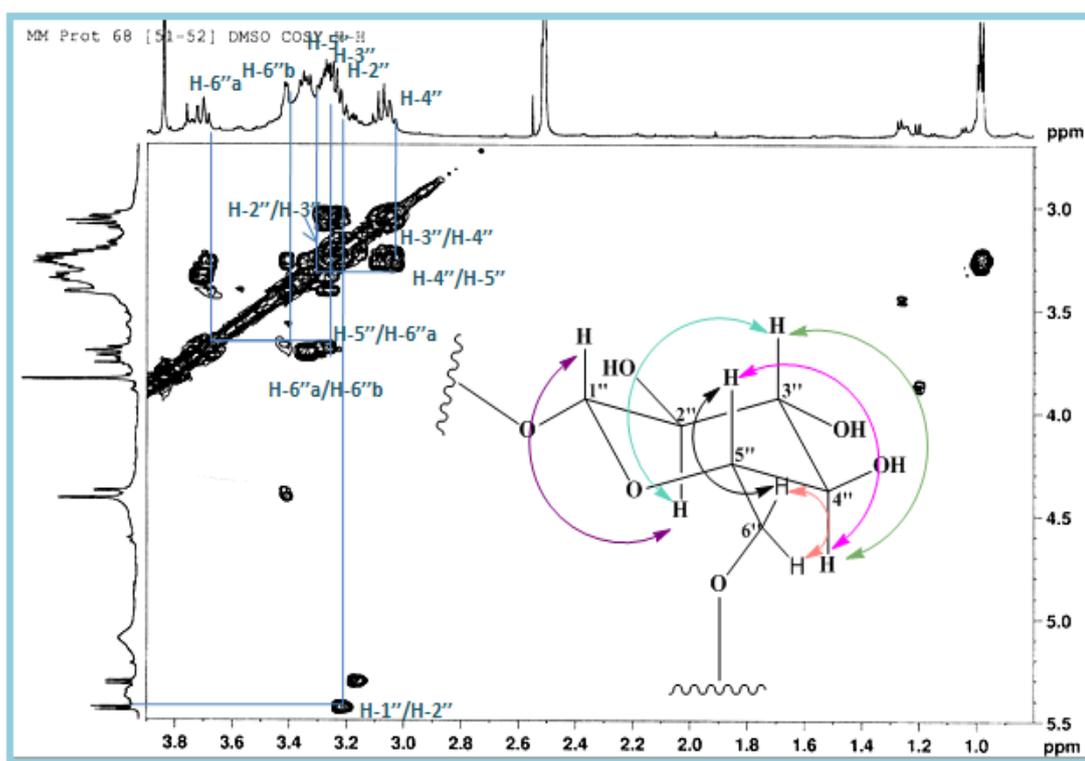
**Figure 68** : Spectre HMBC de la partie aglycone du composé **B**

Le signal du carbone résonant à  $\delta_C$  133,5 est attribuable au carbone C-3 de la génine. Le signal apparaissant à 177,7 ppm correspond au carbone du carbonyle (C-4).

### Identification de la partie osidique

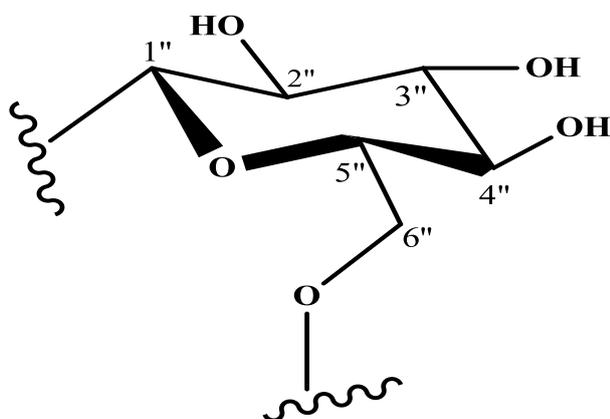
Cette identification est bien évidemment effectuée au moyen de l'expérience COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ . En effet, à partir du proton anomère nommé H-1''  $\delta_{\text{H}}$  5,45 ( $d$  ;  $J = 7,4$  Hz), l'analyse du spectre COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (**Figure 69**) permet d'identifier un système de spins à sept protons d'un hexose, et cela à travers les couplages suivants :

- H-1''/H-2'' ( $\delta_{\text{H}}$  3,22 ;  $dd$  ;  $J = 8,5$  ;  $7,4$  Hz ; H-2'').
- H-2''/H-3'' ( $\delta_{\text{H}}$  3,3 ;  $t$  ;  $J = 8,5$  Hz ; H-3'').
- H-3''/H-4'' ( $\delta_{\text{H}}$  3,05 ;  $t$  ;  $J = 8,5$  Hz ; H-4'').
- H-4''/H-5'' ( $\delta_{\text{H}}$  3,27 ;  $m$  ; H-5'').
- H-5''/H-6'' ( $\delta_{\text{H}}$  3,72 ;  $dd$  ;  $J = 11,4$  ;  $5,1$  Hz ; H-6''a) / ( $\delta_{\text{H}}$  3,35 ;  $dd$  ;  $J = 11,4$  ;  $4,9$  Hz ; H-6''b).



**Figure 69** : Spectre COSY H-H de la partie osidique (Glucose) du composé **B**

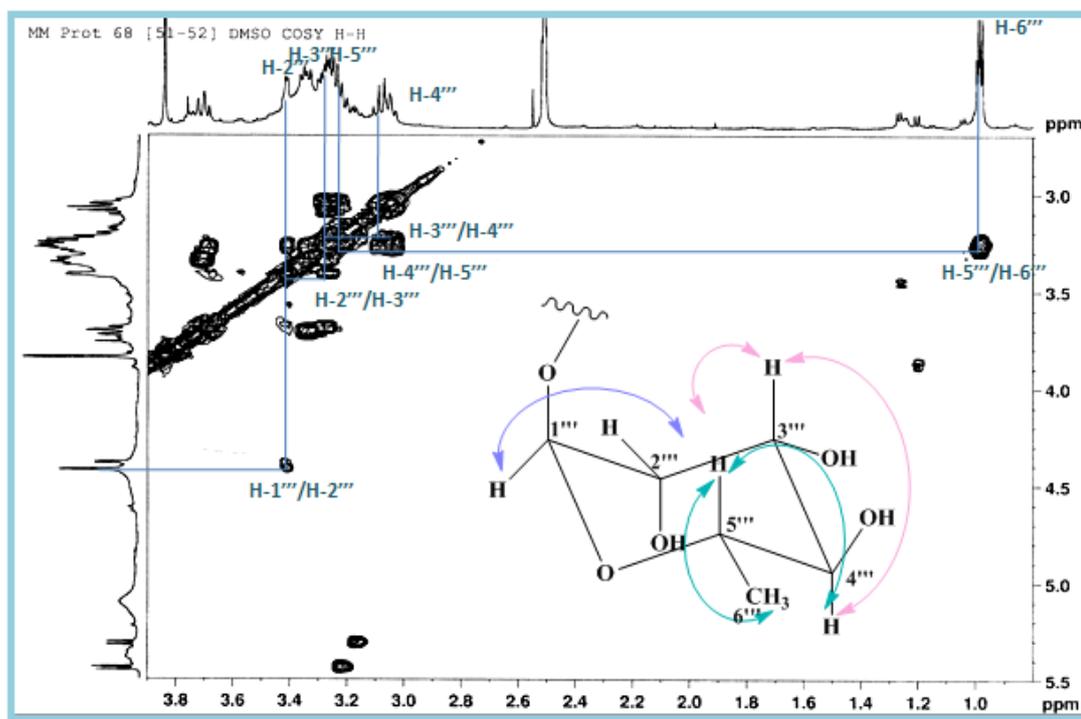
La multiplicité du proton H-4'' sous forme d'un triplet suggérant la position axiale du proton H-4'' et la valeur de la constante de couplage entre les deux protons H-1'' et H-2'' ( $J = 7,4$  Hz), permettent d'identifier un glucose de configuration  $\beta$  (**Figure 70**).



**Figure 70:** Structure du  $\beta$ -D-glucose

Partant du second proton anomère H-1'' ( $\delta_H$  4,59 ( $d$ ;  $J = 1,3$ ), l'analyse du spectre COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (**Figures 71**) permet d'identifier un autre système de spins à huit protons d'un 6-déoxyhexose, et cela à travers les couplages suivants :

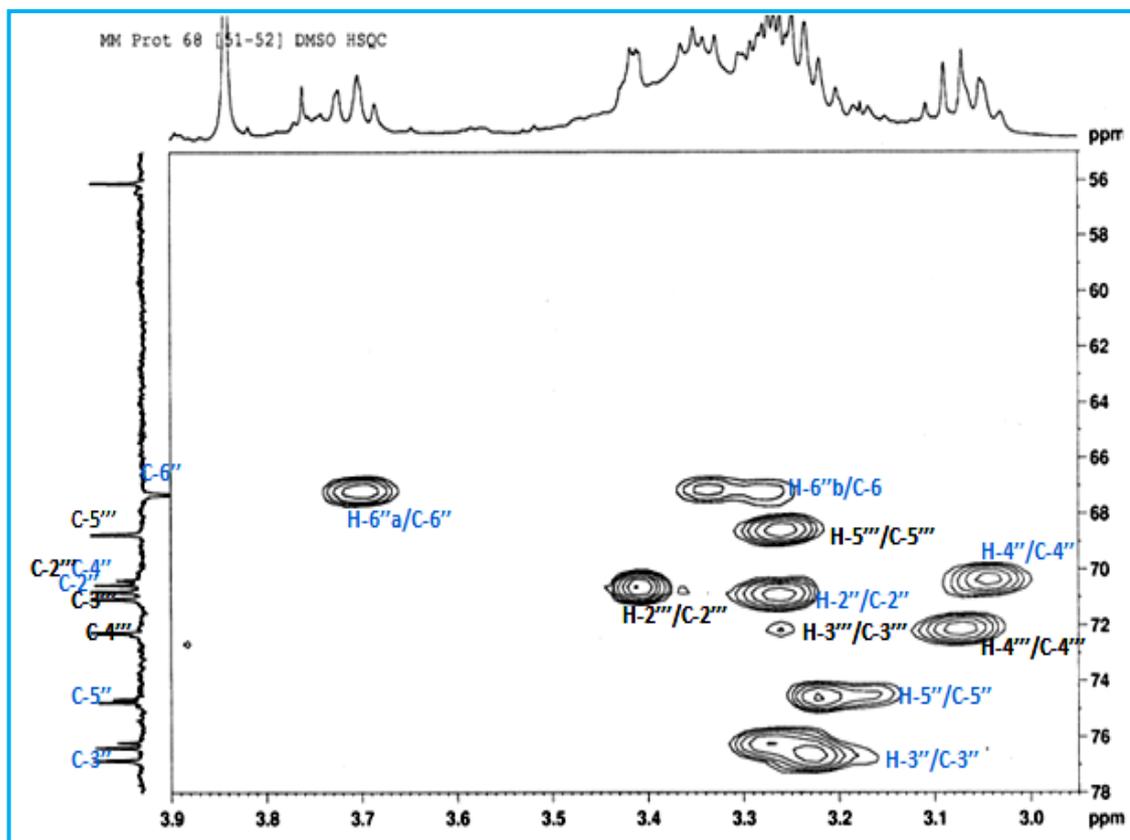
- H-1''/H-2'' ( $\delta_H$  3,42 ;  $m$  ; H-2'').
- H-2''/H-3'' ( $\delta_H$  3,52 ;  $dd$  ;  $J = 9,4$  ; 1,5 Hz ; H-3'').
- H-3''/H-4'' ( $\delta_H$  3,3 ;  $t$  ;  $J = 9,5$  Hz ; H-4'').
- H-4''/H-5'' ( $\delta_H$  3,43 ;  $m$  ; H-5'').
- H-5'' / H<sub>3</sub>-6'' ( $\delta_H$  0,98 ;  $d$  ;  $J = 6,2$  Hz ; H<sub>3</sub>-6'').



**Figure 71 :** Spectre COSY H-H de la partie osidique (Rhamnose) du composé **B**

Le couplage  $H-5'''/H_3-6'''$  et la valeur de la constante de couplage  $J = 1,3$  Hz entre  $H-1'''/H-2'''$  conduisent à caractériser un  $\alpha$ -L-rhamnose.

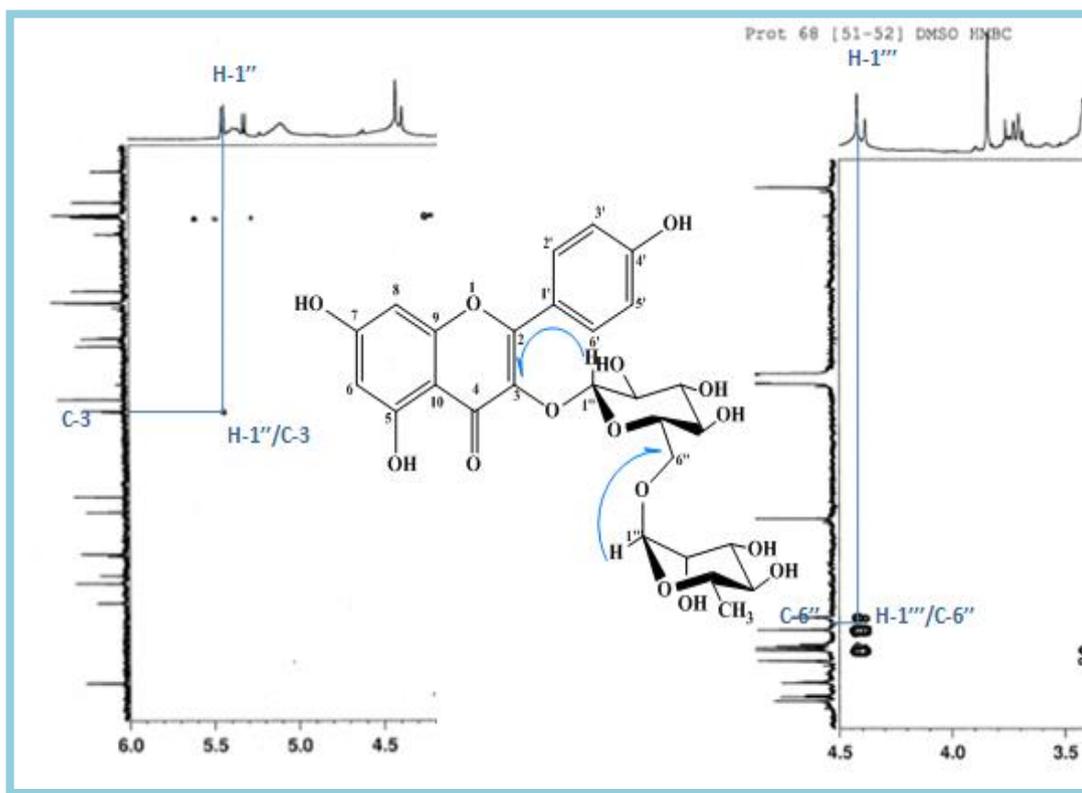
A partir des protons identifiés précédemment, l'expérience hétéronucléaire HSQC permet de repérer les carbones qui les portent (**Figure 72**).



**Figure 72** : Spectre HSQC de la partie osidique du composé **B**

La séquence et les sites de fixation des différents fragments (aglycone et sucre) ont été déterminés par expérience HMBC (**Figure 73**) qui montre les corrélations entre :

- Le proton anomère  $H-1''$  ( $\delta_H$  5,45) du glucose et le carbone  $C-3$  (133,5 ppm) de la génine.
- Le proton anomère  $H-1'''$  ( $\delta_H$  4,59) du rhamnose et le carbone  $C-6''$  (67,2 ppm) du glucose.



**Figure 73** : Spectre HMBC de la partie osidique du composé **B**

Toutes ces données spectroscopiques obtenues précédemment (**Tableau 24**), ainsi la comparaison avec les données reportées dans la littérature (**Han et al., 2004**), nous ont permis d'identifier la structure du composé **B** au Kaempférol 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1'''-6'')- $\beta$ -D-glucopyranoside.

Ce composé, appelé aussi Kaempférol 3-*O*-rutinoside ou nicotiflorine, a été isolé antérieurement des espèces *Astragalus cruciatus* Link. (**Benchadi et al., 2013**), *Carthamus tinctorius* L. (**Wang et al., 2015**), *Gynura formosana* Kiamnra (**Hou et al., 2005**) et *Cassia auriculata* (**Habtemariam, 2013**). Il possède les activités biologiques à savoir :

- Hépatoprotectrice (**Wang et al., 2015**).
- Antioxydante (**Hou et al., 2005**).
- Antidiabétique (**Habtemariam, 2013**).

**Tableau 24** : Les déplacements chimiques RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz) et -<sup>13</sup>C (125 MHz) de la génine (aglycone) et des sucres du composé **B**

Position	$\delta_H$ (ppm), <i>m</i> , J(Hz)	$\delta_C$ (ppm)
<b>1</b>	—	—
<b>2</b>	—	156,8
<b>3</b>	—	133,5
<b>4</b>	—	177,7
<b>5</b>	—	161,6
<b>6</b>	6,21; <i>d</i> ; (1,8)	99,2
<b>7</b>	—	164,8
<b>8</b>	6,4; <i>d</i> ; (1,8)	94,3
<b>9</b>	—	156,9
<b>10</b>	—	104,4
<b>1'</b>	—	121,5
<b>2',6'</b>	8,1 ; <i>d</i> ; (8,8)	131,3
<b>3',5'</b>	6,91 ; <i>d</i> ; (8,8)	115,5
<b>4'</b>	—	160,4
<b>3-O- Glu</b>		
<b>1''</b>	5,45 ; <i>d</i> (7,4)	101,6
<b>2''</b>	3,22 ; <i>dd</i> ; (8,5 ; 7,4)	74,1
<b>3''</b>	3,3; <i>t</i> ; (8,5)	75,7
<b>4''</b>	3,05 ; <i>t</i> ; (8,5)	70,7
<b>5''</b>	3,27; <i>m</i>	76,2
<b>6''</b>	H-6'' <sub>a</sub> 3,72 ; <i>dd</i> (11,4 ; 5,1)	67,2
	H-6'' <sub>b</sub> 3,35 ; <i>dd</i> (11,4 ; 4,9)	
<b>Rha-(1'''→6'')-Glu</b>		
<b>1'''</b>	4,59 ; <i>d</i> ; (1,3)	100,3
<b>2'''</b>	3,42 ; <i>m</i>	70,0
<b>3'''</b>	3,52 ; <i>dd</i> ; (9,4 ; 1,5)	70,1
<b>4'''</b>	3,3 ; <i>t</i> ; (9,5)	71,6
<b>5'''</b>	3,43 ; <i>m</i>	68,1
<b>6'''</b>	0,98; <i>d</i> ; (6,2)	18,2

## **Conclusion et perspectives**

---

La conception et la réalisation de ce travail s'inscrit dans le cadre des travaux de recherche sur les molécules bioactives d'origine végétale, par l'évaluation des activités biologique *in vitro* et l'investigation phytochimique de la plante *Ephedra altissima* Desf. appartenant à la famille des Ephedraceae, largement utilisée en médecine traditionnelle pour traiter plusieurs maladies respiratoires et le diabète.

Le screening phytochimique réalisé sur les extraits (EP, AcOEt et *n*-BuOH) a révélé la richesse de cette plante en métabolites secondaires, où nous avons constaté la présence des tanins galliques et catéchiques, les flavonoïdes, les terpénoïdes, les stéroïdes, les coumarines, les saponines et les caroténoïdes, alors que les alcaloïdes, les quinones et les anthraquinones sont absents.

L'analyse quantitative des composés bioactifs des différents extraits par les méthodes colorimétriques a montré la richesse des extraits AcOEt et *n*-BuOH en polyphénols et flavonoïdes. Cependant, de très faibles concentrations en tannins condensés ont été estimées dans tous les extraits.

L'évaluation de l'activité antioxydante a révélé que l'extrait acétate d'éthyle présente une activité supérieure à celle des extraits *n*-BuOH et éther de pétrole dans les différents systèmes à savoir le test de piégeage des radicaux libres DPPH, le pouvoir réducteur du fer (FRAP), la capacité antioxydante totale (CAT), la capacité antioxydante par réduction de permanganate, le test de blanchissement du  $\beta$ -carotène et l'inhibition de la peroxydation lipidique par la méthode au thiocyanate ferrique (FTC). Toutefois, l'extrait *n*-BuOH a montré une activité antioxydante très remarquable par rapport aux autres extraits dans le test de piégeage du peroxyde d'hydrogène. De plus, l'extrait aqueux d'*E. altissima* a exhibé une bonne activité antioxydante par la méthode potentiométrique. Cette activité antioxydante peut être expliquée par la présence de composés phénoliques et des composés flavonoïdiques.

Les résultats de l'activité anti-artéritique révèlent que tous les extraits (EP, AcOEt et *n*-BuOH) empêchent la dénaturation de la BSA d'une manière dose dépendante. Le pourcentage maximal de l'effet inhibiteur a été observé dans l'extrait AcOEt suivi des extraits *n*-BuOH et EP. Ceci, nous permet de suggérer que les extraits obtenus de la plante *E. altissima* seraient d'éventuels candidats pour le développement des médicaments anti-inflammatoires et anti-arthritiques.

L'évaluation de l'inhibition de l'activité  $\alpha$ -amylase et de la lipase pancréatique a été aussi estimée. Les résultats ont révélé que tous les extraits présentent une activité inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase d'une manière dose-dépendante, ce qui permet de suggérer que les extraits de

la plante *E. altissima* peuvent être utilisés comme des agents anti-diabétiques pour améliorer le contrôle de l'hyperglycémie postprandiale. Cet effet inhibiteur pourrait être l'un des mécanismes d'action de la plante *E. altissima* en tant qu'agent antidiabétique. L'espèce *E. altissima* possède à la fois des activités inhibitrices de l' $\alpha$ -amylase et de la lipase pancréatique et, par conséquent, son utilisation peut être une bonne stratégie pour traiter le diabète de type 2 lié à l'obésité.

Les modèles de la digestion gastro-intestinale (DGI) *in vitro* sont des outils puissants pour simuler les conditions physiologiques de la digestion humaine. Afin d'évaluer les modifications induites par la DGI, l'activité antioxydante des extraits a été déterminée avant et après la DGI *in vitro* avec deux tests différents ; le test de piégeage des radicaux libres ABTS $\cdot$  et le pouvoir réducteur du fer exprimé en équivalent de Trolox (TEAC). Avant la digestion, les résultats ont montré que tous les extraits testés possèdent une capacité à piéger les radicaux libres ABTS $\cdot$  et de réduire le fer III en fer II. Après la DGI, une diminution significative dans la capacité antioxydante des extraits AcOEt et *n*-BuOH a été constatée. Cependant, nous avons observé une augmentation dans la capacité de piégeage des radicaux ABTS $\cdot$  et du pouvoir réducteur de fer de l'extrait EP après la DGI, par rapport à l'échantillon non digéré. Après l'ingestion, les polyphénols peuvent subir des transformations chimiques dues aux conditions physiologiques du tractus gastro-intestinal, affectant ainsi leurs propriétés bioactives.

Le pouvoir antibactérien des extraits bruts obtenus de la plante *E. altissima* a été déterminé par la méthode de diffusion sur disque en milieu gélosé. Tous les extraits testés exercent une activité antibactérienne dose dépendante, l'extrait d'acétate d'éthyle est le plus efficace, il révèle un effet remarquable sur l'ensemble des souches testées à différentes concentrations avec des valeurs de CMI comprises entre (12,5 et 50  $\mu$ g/ml). L'extrait *n*-BuOH exerce un effet antibactérien contre toutes les souches à Gram (-) testées et une souche de Gram (+) (*Streptococcus mutans*). Les souches *Streptococcus pneumoniae* et *Staphylococcus aureus* sont résistantes aux différentes concentrations de l'extrait *n*-BuOH. Aucune zone d'inhibition n'a été déterminée avec l'extrait EP contre toutes les souches à Gram (-) testées, par contre il exerce une activité antibactérienne contre toutes les bactéries à Gram (+) testées avec des valeurs de CMI établies à 12,5  $\mu$ g/ml pour *Streptococcus mutans* et 50  $\mu$ g/ml pour *Staphylococcus aureus*.

L'analyse des extraits par LC-DAD-ESI/MS a révélé la présence d'un grand nombre de métabolites secondaires. Dix-neuf composés différents sont détectés, huit sont des acides phénoliques simples et des dérivés d'acide phénolique, et onze sont des flavonoïdes liés à des

groupes glycosyles. L'isovitexine-2-*O*-rhamnoside ainsi que la vicénine II sont les principaux composés de la fraction *n*-butanolique. Cependant, le kaempférol-3-*O*-rhamnoside et l'acide protocatéchuique ont été trouvés en quantités significatives dans la fraction d'acétate d'éthyle,

L'investigation phytochimique réalisée sur l'extrait *n*-butanolique a conduit à l'isolement et l'identification structurale de deux flavonoides glycosylés nommés : Isorhamnétine 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1''''-6'')- $\beta$ -D-galactopyranoside et Kaempférol 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1''''-6'')- $\beta$ -D-glucopyranoside.

L'isolement de ces deux flavonoides glycosylés, à partir de l'extrait butanolique de la plante, a été réalisé au moyen des techniques chromatographiques à savoir ; la chromatographie liquide sous vide (VLC), la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie sur plaque préparative (CCE), et la chromatographie sur colonne ouverte (CC).

L'identification des métabolites secondaires isolés dans le cadre de ce travail est rendue possible grâce à l'utilisation combinée des différentes méthodes d'analyse spectroscopiques particulièrement la RMN 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé) et 2D (COSY H-H, HSQC *J*-modulé, HMBC et TOCSY), la spectroscopie de masse ESI-MS, l'ultra-violet et la comparaison avec les données de la littérature.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude n'est qu'une étape préliminaire dans la recherche des molécules bioactives de la plante *E. altissima*. Ainsi, plusieurs perspectives découlent de ce travail en vue d'une application expérimentale complémentaire sur les extraits de cette plante :

- Mener des études de toxicité chez l'animal afin de s'assurer de l'innocuité des principes actifs de l'espèce *E. altissima*.
- L'évaluation des activités biologiques *in vivo* (activité antioxydante, activité anti-inflammatoire, activité antipyrétique, activité analgésique, activité antiulcéreuse.....).
- L'évaluation des autres activités biologiques *in vitro* (activité anti-proliférative, activité anti-hémolytique, l'activité inhibitrice de  $\alpha$ -glucosidase.....)
- Etude des activités biologiques des produits isolés et l'investigation phytochimique de l'extrait acétate d'éthyle.
- Identifier les molécules présentes dans les extraits soumis au modèle de la digestion gastro-intestinale *in vitro* par des techniques plus performantes (HPLC, LC-MS...).
- Application de nouvelles stratégies afin d'éviter la dégradation des polyphénols lors de la digestion, telles que la micro et la nanoencapsulation avec différents polymères.

# Références bibliographiques

---

**Aboaba, O.O., & Efuwape, B.M. (2001).** Antibacterial properties of some Nigerian species. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *13*, 183-188.

**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. Doi: 10.1002/ptr.1337.

**Aganga, A.A., & Mosase, K.W. (2001).** Tannins content, nutritive value and dry matter digestibility of *Lonchocarpus capussa*, *Ziziphus mucropata*, *Sclerocarya birrea*, *Kirkia acuminata* and *Rhus lancea* seeds. *Animal Feed Science and Technology*, *91*(1/2), 107-113. Doi:10.1016/s0377-8401(01)00235-8.

**Ahmad, I., & Beg, A.Z. (2001).** Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *Journal of Ethnopharmacology*, *74*(2), 113-123. Doi: 10.1016/s0378-8741(00)00335-4.

**Alali, F., Tawaha, K., El-Elimat, T., Syouf, M., El-Fayad, M., Abulaila, K., Nielsen, S.J., Wheaton, W.D., Falkinham, J.O., & Oberlies, N.H. (2007).** Antioxidant activity and total phenolic content of aqueous and methanolic extracts of Jordanian plants: an ICBG project. *Natural Product Research*, *21*(12), 1121-1131. Doi.org/10.1080/14786410701590285

**Al-Khalil, S. (1998).** Transthorine, a new quinoline alkaloid from *Ephedra transitoria*. *Journal of Natural Products*, *61*(2), 262-263. Doi: 10.1021/np9702998.

**Al-Qarawi, A.A., AbdAllah, 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.

**Al-Rimawi, F., Abu-Lafi, S., Abbadi, J., Alamarneh, A., Sawahreh, R.A., & Odeh, I. (2017).** Analysis of phenolic and flavonoids of wild *Ephedra alata* plant extracts by LC/PDA and LC/MS and their antioxidant activity. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, *14*(2), 130-141. Doi: 10.21010/ajtcam.v14i2.14

**Al-Snafi, A.E. (2017).** Therapeutic Importance of *Ephedra alata* and *Ephedra Foliata*- a Review. *Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences*, *4*(2), 399-406. Doi: 10.5281/zenodo.376634.

**Alugoku, P., Dinesh, B.J., & Latha, P. (2015).** Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, *30*(1), 11-26. Doi: 10.1007/s12291-014-0446-0.

**Amakura, Y., Yoshimura, M., Yamakami, S., Yoshida, T., Wakana, D., Hyuga, M., Hyuga, S., Hanawa, T., & Goda, Y. (2013).** Characterization of phenolic constituents from *Ephedra* herb extract. *Molecules*, 18(5), 5326-5334. Doi:10.3390/molecules18055326.

**Amarowicz, R., Naczek, M., & Shahidi, F. (2000).** Antioxidant Activity of Crude Tannins of Canola and Rapeseed Hulls. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(9), 957-961. Doi: 10.1007/s11746-000-0151-0.

**Antunes-Ricardo, M., Rodríguez-Rodríguez, C., Gutiérrez-Urbe, J., Cepeda-Cañedo, E., & Serna-Saldívar, S. (2017).** Bioaccessibility, intestinal permeability and plasma stability of isorhamnetin glycosides from *Opuntia ficus-indica* (L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8), 1816-1830. Doi: 10.3390/ijms18081816.

**Arnao, M.B., Cano, A., & Acosta, M. (2001).** The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, 73(2), 239-244. Doi:10.1016/s0308-8146(00)00324-1.

**Arshad, H., Shadma, W., Iffat, Z., & Sarfaraj, H. (2010).** Antibacterial activity of the leaves of *Coccinia indica* (W and A) wof India. *Advances in Biological Research*, 4(5), 241-248.

**Arya, D., Meena, M., Neha, G., & Vidya, P. (2014).** In vitro anti-inflammatory and antiarthritic activity in methanolic extract of *Cocculus hirsutus* (L.) Diels. *International journal of pharmaceutical sciences and research*, 5(5), 1957-1962. Doi: org/10.13040/IJPSR.0975-8232.5(5).1957-62.

**Athamena, S., Chalghem, I., Kassah-Laouar, A., Laroui, S., & Khebri, S. (2010).** Activité anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* l. *Lebanese Science Journal*, 11(1), 69-81.

**Atta, U. R. (2018).** Studies in natural products chemistry (Ed). Elsevier, 68, p. 85-122.

**Balasundram, N., Yew, A.I.T., Sambanthamurthi, R., Sundram, K., & Samman, S. (2005).** Antioxidant properties of palm fruit extracts. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 4(5), 319-324.

**Banerjee, S., Chanda, A., Adhikari, A., Das, A.K., & Biswas, S. (2014).** Evaluation of phytochemical screening and anti-inflammatory activity of leaves and stem of *Mikania scandens* (L.) wild. *Annals of Medical and Health Science Research*, 4(4), 532-536. Doi: 10.4103/2141-9248.139302.

**Barkaoui, M., Katiri, A., Boubaker, H., & Msanda, F. (2017).** Ethnobotanical survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes in Chtouka Ait Baha and Tiznit (Western anti-atlas), Morocco. *Journal of Ethnopharmacology*, 198, 338-350. Doi: org/10.1016/j.jep.2017.01.023.

**Batz, F., Hitchens, K., & Jellin, J.M. (2012).** Pharmacist's letter/Prescriber's letter natural medicines comprehensive database, 13<sup>th</sup> edn. Therapeutic Research Faculty, Stockton.

**Bauer, M.E., & De la Fuente, M. (2016).** The role of oxidative and inflammatory stress and persistent viral infections in immunosenescence. *Mechanisms of Ageing and Development*, 158, 27-37. Doi: 10.1016/j.mad.2016.01.001.

**Benchadi, W., Haba, H., Lavaud, C., Harakat, D., & Benkhaled, M. (2013).** Secondary metabolites of *Astragalus cruciatus* Link. and their chemotaxonomic significance. *Records of Natural Products*, 7(2), 105-113.

**Bergmann, H., Rogoll, D., Scheppach, W., Melcher, R., & Richling, E. (2009).** The using type chamber model to study the intestinal transport and modulation of specific tightjunction genes using a colonic cell line. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(10), 1211-1225. Doi: 10.1002/mnfr.200800498.

**Bergogne, B.E., & Dellamonica, P. (1995).** Antibiothérapie en pratique clinique(Ed). Masson, Paris, p. 486.

**Berkey, D.B., Brown, L.J., Dominick, P.D., Di-Angelis, A.J., Garcia, R.I., Niederman, R., & O'Hehir, T.E. (2011).** Phytochemicals. *Dental Abstracts*, 56(2), 97-99.

**Bibi Sadeer, N., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., & Mahomoodally, M.F. (2020).** The versatility of antioxidant assays in food science and safety-chemistry, applications, strengths, and limitations. *Antioxidants*, 9(8), 709-748. Doi: org/10.3390/antiox9080709

**Blois, M.S. (1958).** Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200. Doi : org/10.1038/1811199a0.

**Boehlke, C., Zierau, O., & Hannig, C., (2015).** Salivary amylase-the enzyme of unspecialized euryphagous animals. *Archives of Oral Biology*, 60(8), 1162-1176. Doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.05.008.

**Boeing, J.S., Barizão, É.O., Silva, B.C., Montanher, P.F., De Cinque Almeida, V., & Visentainer, J.V. (2014).** Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic

compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. *Chemistry Central Journal*, 8(1), 48-56. Doi: 10.1186/s13065-014-0048-1.

**Bone, K., & Mills, S. (2012).** Principles and practice of phytotherapy modern herbal medicine, 2nd Ed. Elsevier Health Sciences, p: 17-82.

**Bonjar Shahidi, G.H. (2004).** Evaluation of antibacterial properties of Iranian medicinal-plants against *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* and *Bordetella bronchiseptica*. *Asian Journal of Plant Sciences*, 3(1), 82-86. Doi: 10.3923/ajps.2004.82.86.

**Bonnier, G. (1934).** Flore complète illustrée en couleurs de France, Suisse et Belgique. Librairie Générale de l'Enseignement, Paris (FRANCE).

**Bouafia, M., Amamou, F., Gherib, Mohamed., Benaissa, M., Azzi, R., Nemmiche, Saïd. (2021).** Ethnobotanical and ethnomedicinal analysis of wild medicinal plants traditionally used in Naâma, southwest Algeria. *Vegetos*, Doi: org/10.1007/s42535-021-00229-7.

**Boubaker, J., Sghaier, M.B., Skandrani, I., Ghedira, K., & Chekir-Ghedira, L. (2012).** Isorhamnetin 3-O-robinobioside from *Nitraria retusa* leaves enhance antioxidant and antigenotoxic activity in human chronic myelogenous leukemia cell line K562. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12(1), 135-143. Doi: 10.1186/1472-6882-12-135.

**Bouzabata, A. (2017).** Les médicaments à base de plantes en Algérie: réglementation et enregistrement. *Phytotherapie*, 15:401-408. Doi : org/ 10. 1007/ s10298- 016- 1089-5.

**Boyer, J., Brown, D., & Liu, R.H. (2005).** *In vitro* digestion and lactase treatment influence uptake of quercetin and quercetin glucoside by the Caco-2 cell monolayer. *Nutrition Journal*, 4, 1-15. Doi:10.1186/1475-2891-4-1.

**Brainina, K., Stozhko, N., Bukharinova, M., Khamzina, E., Vidrevich, M. (2019).** Potentiometric method of plant microsuspensions antioxidant activity determination. *Food Chemistry*, 278, 653-658. Doi:10.1016/j.foodchem.2018.11.098.

**Bruneton, J. (1993).** Pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales. 2<sup>ème</sup> Edition édition. Tec et Doc (Ed). Paris, p 914.

**Burgos-Edwards, A., Jiménez-Aspee, F., Thomas-Valdés, S., Schmeda-Hirschmann, G., & Theoduloz, C. (2017).** Qualitative and quantitative changes in polyphenol composition and bioactivity of *Ribes magellanicum* and *R. punctatum* after *in*

*in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 237, 1073-1082. Doi: org/10.1016/j.foodchem.2017.06.060.

**Bussmanna, R.W., Malca-Garcia, G., Glenna, A., Sharona, D., Chaitc, G., Diaz, D., Pourmandd, K., Jonatd, B., Somogye, S., Guardadof, G., Aguirref, C., Chanf, R., Meyera, K., Kuhlmana, A., Townesmitha, A., Effio-Carbajalb, J., Frias-Fernandezb, F., & Benitob, M., (2010).** Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, 132(1), 101-108. Doi: 10.1016/j.jep.2010.07.048.

**Bussmanna, R.W., Sharon, D., Perez, F., Diaz, D., Ford, T., Rasheed, T., Barocio Y., & Silva, R. (2008).** Antibacterial activity of northern-peruvian medicinal plants. *Arnaldoa*, 15(1), 127-148.

**Cai, S., Wang, O., Wang, M., He, J., Wang, Y., Zhang, D., Zhou, F., & Ji, B. (2012).** *In vitro* inhibitory effect on pancreatic lipase activity of subfractions from ethanol extracts of fermented oats (*Avena sativa* L.) and synergistic effect of three phenolic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(29), 7245-7251. Doi: org/10.1021/jf3009958

**Cao, X., Wei, Y., & Ito, Y. (2009).** Preparative isolation of isorhamnetin from *Stigma maydis* using high-speed countercurrent chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 32(2), 2732-2780. Doi:org/10.1080/10826070802603369.

**Carr, A., McCall, M.R., & Frei, B. (2000).** Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species-reaction pathways and antioxidant protection. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(7), 1716-1723. Doi: org/10.1161/01.ATV.20.7.1716.

**CASFM/EUCAST. (2018).** Détermination de la sensibilité aux antibiotiques. Société Française de Microbiologie, siège social - Institut Pasteur Paris (vol. 2), p.7-15.

**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), 1199-208. Doi: 10.2307/3558330.

**Cervellati, R., Galletti, P., Greco, E., Cocuzza, C.E.A., Musumeci, R., Bardini, L., Paolucci, F., Pori, M., Soldati, R., & Giacomini, D. (2013).** Monocyclic  $\beta$ -lactams as antibacterial agents: Facing antioxidant activity of Nmethylthio-azetidionones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 60, 340-349. Doi: org/10.1016/j.ejmech.2012.12.024.

**Chandrasekar, V., Belur P.D., & Regupathi, I. (2016).** Effect of hydroxybenzoic acids antioxidants on the oxidative stability of sardine oil. *Resource-Efficient Technologies*, 2(1), S114-S118. Doi: 10.1016/j.reffit.2016.11.008.

**Charles, N.S., Peter, A.W., & Derek, W.G. (2010).** Fundamentals of inflammation. Cambridge University Press: 2-3p. Doi : org/10.1017/CBO9781139195737.

**Chauhan, A., Sharma, P.K., Srivastava, P., Kumar, N., & Dudhe, R. (2010).** Plants having potential antidiabetic activity: a review. *Der Pharmacia Lettre*, 2(3), 369-387.

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

**Chelladurai, G.R.M., & Chinnachamy, C. (2018).** Alpha amylase and alpha glucosidase inhibitory effects of aqueous stem extract of *Salacia oblonga* and its GC-MS analysis. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54(1), 1-10. Doi: org/10.1590/s2175-97902018000117151.

**Chen, H.J., Inbaraj, B.S., & Chen, B.H. (2012).** Determination of phenolic acids and flavonoids in *taraxacum formosanum* kitam by liquid chromatography tandem mass spectrometry coupled with a post-column derivatization technique. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(1), 260-285. Doi: 10.3390/ijms13010260.

**Chen, T.S., Liou, S.Y., Wu, H.C., Tsai, F.J., Tsai C.H., Huang, C.Y., & Chang, Y.L., (2010).** New analytical method for investigating the antioxidant power of food extracts on the basis of their electron-donating ability: comparison to the ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(15), 8477-8480. Doi: 10.1021/jf9044292.

**Chevion, M., Berenshtein, E., & Stadtman, E.R. (2000).** Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radical Research*, 33, 99-108.

**Chiasson, J.L., Josse, R.G., Gomis, R., Hanefeld M, Karasik A, & Laakso M. (2002).** Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial. *Lancet*, 359(9323), 2072-2077. Doi: 10.1016/S0140-6736(02)08905-5.

**Choi, J.G., Kang, O.H., Lee, Y.S., Chae, H.S., Oh, Y.C., Brice, O.O., Kim, M.S., Sohn, D.H., Kim, H.S., Park, H., Shin, D.W., Rho, J.R., & Kwon, D.Y. (2011).** *In vitro*

and *in vivo* antibacterial activity of *Punica granatum* Peel ethanol extract against *Salmonella*. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2011(5), 1-8. Doi: org/10.1093/ecam/nep105.

**Chumbalov, M.A.M., Barakat, H.H., Buddrust, J., & Linscheidt, M. (1985).** Alkaloidal, lignan and phenolic constituents of *Ephedra alata*. *Phytochemistry*, 24(4), 878-79. Doi: org/10.1016/S0031-9422(00)84920-1.

**Chumbalov, T.K., Chekmeneva, L.N., & Polyakov, V.V. (1977).** Phenolic acids of *Ephedra equisetina*. *Chemistry of Natural Compounds*, 13, 238-239. Doi: org/10.1007/BF00563959.

**Chung, K.T., Stevens, J.S.E., Lin, W.F., & Wei, C.I. (1993).** Growth inhibition of selected food-borne bacteria by tannic acid, propyl gallate and related compounds. *Letters in Applied Microbiology*, 17(1), 29-32. Doi: org/10.1111/j.1472-765X.1993.tb01428.x.

**Chung, Y.C., Chang, C.T., Chao, W.W., Lin, C.F., & Chou, S.T. (2002).** Antioxidative activity and safety of the 50 ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2454-2458. Doi: 10.1021/jf011369q.

**Cillard, J., & Cillard, P. (2006).** Mécanismes de la peroxydation lipidique et des antioxydations. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 13(1), 24-29. Doi : org/10.1051/occl.2006.6666.

**Copolovici, L., & Baldea, I. (2007).** Kinetics of the phenol oxidation by permanganate in acidic media . *Revue Roumaine de Chimie*, 52(11), 1045-1050.

**Costacou, T., & Mayer-Davis, E.J. (2003).** Nutrition and prevention of type 2 diabetes. *Annual Review of Nutrition*, 23, 147-170. Doi: org/10.1146/annurev.nutr.23.011702.073027.

**Cottiglia, F., Bonsignore, L., Casu, L., Deidda, D., Pompei, R., Casu, M., & Floris, C. (2005).** Phenolic constituents from *Ephedra nebrodensis*. *Natural Product Research*, 19(2), 117-123. Doi: org/10.1080/14786410410001704714.

**Cowan, M.M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564-582.

**Da Silva Pinto, M., Kwon, Y.I., Apostolidis, E., Lajolo, F.M., Genovese, M.I., & Shetty, K. (2010).** Evaluation of red currants (*Ribes rubrum* L.), black currants (*Ribes nigrum*

L.), red and green gooseberries (*Ribes uva-crispa*) for potential management of type 2 diabetes and hypertension using *in vitro* models. *Journal of Food Biochemistry*, 34(3), 639-660. Doi: org/10.1111/j.1745-4514.2009.00305.x

**Dande, P.R., Talekar, V.S., & Chakraborty, G.S. (2010).** Evaluation of crude saponins extract from leaves of *Sesbania sesban* (L.) Merr. for topical anti-inflammatory activity. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 1(3), 296-299.

**D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., & Masella, R. (2007).** Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-Istituto Superiore di Sanita*, 43(4), 348-361.

**David, B.C., & Sudarsanam, G. (2013).** Antimicrobial activity of *Gymnema sylvestre* (Asclepiadaceae). *Journal of Acute Disease*, 2(3), 222-225. Doi: org/10.1016/S2221-6189(13)60131-6

**De la Garza, A.L., Milagro, F.I., Boque, N., Campion, J., & Martinez, J.A. (2011).** Natural inhibitors of pancreatic lipase as newplayers in obesity treatment, *Planta Medica*, 77(8), 773-785. Doi: 10.1055/s-0030-1270924.

**De Leo, M., De Abreu, M.B., Pawlowska, A.M., Cioni, P.L., & Braca, A. (2010).** Profiling the chemical content of *Opuntia ficus-indica* flowers by HPLC–PDA-ESI-MS and GC/EIMS analyses, *Phytochemistry Letters*, 3(1), 48-52. Doi: org/10.1016/j.phytol.2009.11.004.

**De Boer, M.D. (2013).** Obesity, systemic inflammation, and increased risk for cardiovascular disease and diabetes among adolescents: A need for screening tools to target interventions. *Nutrition*, 29(3), 379-386. Doi: 10.1016/j.nut.2012.07.003.

**Dehkordi, N.V., Kachouie, M.A., Pirbalouti, A.G., Malekpoor, F., & Rabei, M. (2015).** Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of the extract of *Ephedra procera* fisch. et mey. *Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research*, 72(2), 341-345.

**Del Buono, M., Abbate, A., & Toldo, S. (2018).** Interplay of inflammation, oxidative stress and cardiovascular disease in rheumatoid arthritis. *Heart*, 104(24), 1991-1992. Doi: 10.1136/heartjnl-2018-313313.

**Del Rio, D., Costa, L. G., Lean, M. E. J., & Crozier, A. (2010).** Polyphenols and health: what compounds are involved?. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 20(1), 1-6. Doi: org/10.1016/j.numecd.2009.05.015.

**Deshpande, M.C., Venkateswarlu, V., Babu, R.K., & Trivedi, R.K. (2009).** Design and evaluation of oral bioadhesive controlled release formulations of miglitol, intended for prolonged inhibition of intestinal alpha-glucosidases and enhancement of plasma glycogen like peptide-1 levels. *International journal of pharmacy*, 380(1-2), 16-24. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2009.06.024.

**Dhayakaran, R.P.A., Neethirajan, S., Xue, J., & Shi, J. (2015).** Characterization of antimicrobial efficacy of soy isoflavones against pathogenic biofilms. *LWT-Food Science and Technology*, 63(2), 859-865. Doi: org/10.1016/j.lwt.2015.04.053.

**Dillard, C.J., & German, J.B. (2000).** Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(12), 1744-1756. Doi: org/10.1002/1097-0010(20000915)80:12<1744: AID-JSFA725>3.0.CO; 2-W.

**Dobignard, A., & Chatelain, C. (2011).** Index synonymique de la flore d'Afrique du nord. Éditions des conservatoires et jardin botaniques, Genève, 3, p: 1-449.

**Dos Santos, U.P., Tolentino, G.S., Sà Morais, J., Souza, K.P., Estevinho, L.M., & Dos Santos, E.L. (2018).** Physicochemical characterization, microbiological quality and safety, and pharmacological potential of *Hancornia speciosa* gomes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 1-17. Doi : org/10.1155/2018/2976985

**Doss, A., Vijayasanthi, M., Parivuguna, V., & Venkataswamy, R. (2011).** Antimicrobial effects of the flavonoid fractions of *Mimosa pudica* L. Leaves. *Journal of Pharmacy Research*, 4(5), 1438-1439.

**Du, Z., Liu, R., Shao, W., Mao, X., Ma, L., Gu, L., Huang, Z., & Chan, A. (2006).**  $\alpha$ -Glucosidase inhibition of natural curcuminoids and curcumin analogs. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 41(2), 213-218. Doi: org/10.1016/j.ejmech.2005.10.012.

**Dzidic, S., Suskovic, J., & Kos, B. (2008).** Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. *Food Technology and Biotechnology*, 46(1), 11-21.

**Edrah, S.M., Aljenkawi, A., Omeman, A., & Alafid, F. (2016).** Qualitative and quantities analysis of phytochemicals of various extract for *Ephedra altissima* from Libya. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 4(3), 119-121.

**Ek, S., Kartimo, H., Mattila, S., & Tolonen, A. (2006).** Characterization of phenolic compounds from *Lingonberry (Vaccinium vitis-idaea)*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 9834-9842. Doi: org/10.1021/jf0623687.

**El Hage, R., Perrin, D., & Brosse, N. (2012).** Effect of the pre-treatment severity on the antioxidant properties of ethanol *organosolv miscanthus x giganteus* lignin. *Natural Resources*, 3(2), 29-34. Doi:10.4236/NR.2012.32005

**Elegami, A.A., Elnino, E.I., Eltohami, M.S., & Muddathist, K. (2002).** Antibacterial activity of some species of family *Combretaceae*. *Phytotherapy research*, 16(6), 555-561. Doi: 10.1002/ptr.995.

**Elhadi, Y., & Carrillo-Lopez, A. (2019).** Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables, Woodhead Publishing, p: 253-271.

**El-Zayat, M.M., Eraqi, M.M., Alrefai, H., El-Khateeb, A.Y., Ibrahim, M.A., Aljohani, H.M., Aljohani, M.M., Elshaer, M.M. (2021).** The antimicrobial, antioxidant, and anticancer activity of greenly synthesized selenium and zinc composite nanoparticles using *Ephedra aphylla* extract. *Biomolecules*, 11, 470. Doi:org/10.3390/biom11030470.

**Erkan, N., Ayranci, G., & Ayranci, E. (2008).** Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella Sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*, 110(1), 76-82. Doi: 10.1016/j.foodchem.2008.01.058.

**Essawi, T., & Srour, M. (2000).** Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of ethnopharmacology*, 70(3), 343-349. Doi: 10.1016/s0378-8741(99)00187-7.

**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.

**Fan, Y., Li, J., Yin, Q., Zhang, Y., Xu, H., Shi, X., Li, C., Zhou, Y., & Zhou, C. (2015).** Effect of extractions from *Ephedra sinica* Stapf on hyperlipidemia in mice. *Experimental and therapeutic medicine*, 9(2), 619-625. Doi: org/10.3892/etm.2014.2117.

**Farnsworth, N. R. (1966).** Biological and phytochemical screening of plants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55(3), 225-276. Doi:10.1002/jps.2600550302

**Favier, A. (2003).** Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 270, 108-115.

**Fazeli, M.R., Gholamreza, A., Attari, A.M.M., Ashtiani, H., Jamalifar, H., & Samadi, N. (2007).** Antimicrobial activities of Iranian sumac and avishan-e shirazi (*Zataria multiflora*) against some food-borne bacteria. *Food Control*. 18(6), 646-649. Doi: 10.1016/j.foodcont.2006.03.002

**Feresin, G.E., Tapia, A., Lopez, S.N., & Zacchino, S.A. (2001).** Antimicrobial activity of plants used in traditional medicine of Sun Juan Province, Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, 78(1), 103-107. Doi: org/10.1016/S0378-8741(01)00322-1.

**Ferreria, A., Proenca, C., Serralheiro, M. L. M., & Araujo, M. E. M. (2006).** The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plant from portugal. *Journal of ethnopharmacology*, 108(1), 31-37. Doi: 10.1016/j.jep.2006.04.010.

**Frankel, E.N., & Meyer, A.S. (2000).** The problems of using one dimensional method to evaluate multifunctional food and biological antioxidant. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(13), 1925-1940. Doi: org/10.1002/1097-0010(200010)80:13<1925::AID-JSFA714>3.0.CO;2-4.

**Freitag, H., & Maier-Stolte, M. (1989).** The *Ephedra*-species of P. Forss-Kal: identity and typification, *Taxon*, 38(4), 545-556. Doi: 10.2307/1222629.

**Fruchart, J.C. (2009).** Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha): at the crossroads of obesity, diabetes and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 205(1), 1-8. Doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.03.008.

**Ganeshpurkar, A., diwedi, V., & bhardwaj, Y. (2013).** *In vitro*  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory potential of *trigonella foenum-graecum* leaves extract. *Ayu*, 34(1), 109-112. Doi: 10.4103/0974-8520.115446.

**Garcia-Ruiz, A., Bartolomé, B., Martinez-Rodriguez, A.J., Pueyo, E., Martin-Alvarez, P.J., & Moreno-Arribas, M.V. (2008).** Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control*, 19(9), 835-841. Doi: org/10.1016/j.foodcont.2007.08.018.

**Ghafourifar, P., & Cadenas, E. (2005).** Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends in Pharmacological Sciences*, 26(4), 190-195. Doi: 10.1016/j.tips.2005.02.005.

**Ghanem, S., & El-Magly, U.I.A. (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. Doi: 10.1016/s1658-3612(08)70039-8.

**Ghasemi, M., Azarnia, M., Jamali, M., Mirabolghasemi, G., Nazarian, S., Naghizadeh, M. M., & Tahamtani, Y. (2014).** Protective effects of *Ephedra pachyclada* extract on mouse models of carbon tetrachloride-induced chronic and acute liver failure. *Tissue and Cell*, 46(1), 78-85. Doi: 10.1016/j.tice.2013.11.005.

**Ghedira, K. (2005).** Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytotherapy*, 3(4), 162-169. Doi: org/10.1007/s10298-005-0096-8.

**Ghourri, M., Zidane, L., & Douira, A. (2013).** Usage des plantes médicinales dans le traitement du diabète Au Sahara marocain (Tan-Tan). *Journal of Animal and Plant Sciences*, 17(1), 2388-2411. Doi : MMM-05-2010-4-3-1957-2557-101019-201002287.

**Gokturk, B.N., Ozkan, G., & Yasar, S. (2007).** Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts. *Food Control*, 18(9), 1131-1136. Doi: org/10.1016/j.foodcont.2006.06.011

**Goncalves, R., Mateus, N., & De Freitas, V. (2011).** Inhibition of  $\alpha$ -amylase activity by condensed tannins. *Food Chemistry*, 125(2), 665-672. Doi: org/10.1016/j.foodchem.2010.09.061.

**Gondoin, A., Grussu, D., Stewart, D., & Mc Dougall, G. J. (2010).** White and green tea polyphenols inhibit pancreatic lipase *in vitro*. *Food Research International*, 43(5), 1537-1544.

**Govindarajan, R., Vijayakumar, M., & Pushpangadan. P. (2005).** Antioxidant approach to disease management and the role of 'Rasayana' herbs of Ayurveda. *Journal of ethnopharmacology*, 99(2), 165-178. Doi: 10.1016/j.jep.2005.02.035.

**Goyal, R.N., Brajter-Toth, A., & Dryhurst, G. (1982).** Further insights into the electrochemical oxidation of uric acid, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 131(8), 181-202. Doi: org/10.1016/0022-0728(82)87070-8.

**Grassmann, J., Hippeli, S., & Elstner, E. F. (2002).** Plant's defense and its benefits for animals and medicine: Role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(6-8), 471-478. Doi : org/10.1016/S0981-9428(02)01395-5.

**Grundy, S.M., Brewer, H.B., Cleeman, J.I., Smith, S.C., & Lenfant, C. (2004).** Definition of metabolic syndrome: report of the national heart, lung, and blood institute/American heart association conference on scientific issues related to definition. *Circulation*, 109(3), 433-438. Doi: 10.1161/01.CIR.0000111245.75752.C6.

**Gul, Rahman., Jan, S.U., Faridullah, S., Sherani, S., & Jahan, N. (2017).** Preliminary phytochemical screening, quantitative analysis of alkaloids, and antioxidant activity of crude plant extracts from *Ephedra intermedia* indigenous to Balochistan. *The Scientific World Journal*, 2017, 1-7. Doi: 10.1155/2017/5873648.

**Gulati, V., Harding, I.H., & Palombo, E.A. (2012).** Enzyme inhibitory and antioxidant activities of traditional medicinal plants : potential application in the management of hyperglycemia. *BMC complementary and alternative medicine*, 12(77), 1472-6882. Doi: 10.1186/1472-6882-12-77.

**Gullon, B., Pintado, M.E., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J.A., & Viuda-Martos, M. (2015).** *In vitro* gastrointestinal digestion of pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from co-products: Changes in the antioxidant potential and bioactive compounds stability. *Journal of Functional Foods*, 19(A), 617-628. Doi: org/10.1016/j.jff.2015.09.056.

**Gupta, R.K., Patel, A.K., Shah, N., Chaudhary, A.K., Jha, U.K., Yadav, U.C., Gupta, P.K., & Pakuwal, U. (2014).** Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pacific journal of cancer prevention*, 15(11), 4405-4409. Doi: 10.7314/apjcp.2014.15.11.4405.

**Gutiérrez-Grijalva, E.P., Ambriz-Pérez, D.L., Leyva-López, N., Castillo-López, R.I., & Heredia, J.B. (2016).** Review: dietary phenolic compounds, health benefits and bioaccessibility. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 66(2), 87-100.

**Gutiérrez-Grijalva, E.P., Angulo-Escalante, M.A., León-Félix, J., & Heredia, J.B. (2017).** Effect of *in vitro* digestion on the total antioxidant capacity and phenolic content of 3 species of oregano (*Hedeoma patens*, *Lippia graveolens*, *Lippia palmeri*). *Journal of Food Science*, 82(12), 2832-2839. Doi: 10.1111/1750-3841.13954.

**Gy, S., Wélé, A., Ndiaye, M., Diatta, W., Barbosa, F.S., Dièye, A.M., Touré, M.T., Bassène, E., & Faye, B. (2008).** Evaluation de l'activité anti-inflammatoire de feuilles d'*Annona reticulata* (Annonaceae) sur l'oedème aigue de la patte de rat induit par la carragénine. *Pharmacopée et Médecine traditionnelle Africaines*, 15, 23-25.

**Habtemariam, S. (2013).** Anti-hyperlipidemic components of *Cassia auriculata* aerial parts: identification through *in vitro* studies, *Phytotherapy Research*, 27(1), 152-155. Doi: 10.1002/ptr.4711.

**Hackman, R.M., Havel, P.J., Schwartz, H.J., Rutledge, J.C., Watnik, M.R., Noceti, E.M., Stohs, S.J., Stern, J.S., & Keen, C.L. (2006).** Multinutrient supplement containing *Ephedra* and caffeine causes weight loss and improves metabolic risk factors in obese women: a randomized controlled trial. *International journal of obesity*, 30(10), 1545-1556. Doi: 10.1038/sj.ijo.0803283.

**Hagen, J.L., Krause, D.J., Baker, D.J., Fu, M.H., Tarnopolsky, M.A., & Hepple, R. T. (2004).** Skeletal muscle aging in F344BN F1-hybrid rats: I. mitochondrial dysfunction contributes to the age-associated reduction in CO<sub>2</sub>max. *Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 59(11), 1099-1110. Doi: 10.1093/gerona/59.11.1099.

**Halliwell, B. (1999).** How to characterize a biological antioxidant free radical. *Research Communications*, 9(1), 1-32. Doi: 10.3109/10715769009148569.

**Halliwell, B., Zhao, K., & Whiteman, M. (2000).** The gastrointestinal tract: A major site of antioxidant action?. *Free Radical Research*, 33(6), 819-830. Doi: 10.1080/10715760000301341.

**Han, J.T., Bang, M.H., Chun, O.K., Kim, D.O., Lee, C.Y., & Baek, N. I. (2004).** Flavonol glycosides from the aerial parts of *Aceriphyllum rossii* and their antioxidant activities. *Archives of Pharmacal Research*, 27(4), 390-395. Doi: org/10.1007/BF02980079.

**Hanamura, T., Hagiwara, T., & Kawagishi, H. (2005).** Structural and functional characterization of polyphenols isolated from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 69(2), 280-286. Doi: 10.1271/bbb.69.280.

**Hanchinalmath, V. J., & Londonkar, R. (2014).** In vitro antioxidant activities of *Feronia Limonia* linn. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 4(6), 2937-2942.

**Haraguchi, H. (2001).** Antioxidative plant constituents. In *Bioactive compounds from natural sources*, first published. New York: Taylor and Francis Inc. p: 338-377.

**Harisaranraj, R., Suresh, K., & Saravanababu, S. (2009).** Evaluation of the chemical composition *Rauwolfia serpentina* and *Ephedra vulgaris*. *Advances in Biological Research*, 3 (5-6), 174-178.

**Hassan, W.H., Abdelaziz, S., & Al Yousef, H.M. (2019).** Chemical composition and biological activities of the aqueous fraction of *Parkinsonia aculeata* L. growing in Saudi Arabia. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(3), 377-387. Doi: org/10.1016/j.arabjc.2018.08.003.

**Hatano, T., Kusuda, M., Inada, K., Ogawa, T.O., Shiota, S., Tsuchiya, T., & Yoshida, T. (2005).** Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, 66(17), 2047-2055. Doi: 10.1016/j.phytochem.2005.01.013.

**Hayouni, E.A., Abedrabba, M., Bouix, M., & Hamdi, M. (2007).** The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*, 105(3), 1126-1134. Doi: org/10.1016/j.foodchem.2007.02.010.

**Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572-584. Doi: org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5.

**Hammiche, V., & Maiza, K. (2006).** Traditional medicine in central Sahara: pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *Journal of Ethnopharmacology*, 105(3), 358-367. Doi: 10.1016/j.jep.2005.11.028

**Ho, E., Karimi, G.K., Liu, C.C., Bhindi, R., & Figtree, G.A. (2013).** Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biology*, 1(1), 483-491. Doi: 10.1016/j.redox.2013.07.006.

**Hou, W.C., Lin, R.D., Lee, T.H., Huang, Y.H., Hsu, F.L., & Lee, M.H. (2005).** The phenolic constituents and free radical scavenging activities of *Gynura formosana* Kiamnra, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(4), 615-621. Doi: org/10.1002/jsfa.2017.

**Hussein, S.A.M., Barakat, H.H., Nawar, M.A.M., Willuhn, G. (1997).** Flavonoids from *Ephedra aphylla*. *Phytochemistry*, 45(7), 1529-1532. Doi: org/10.1016/S0031-9422(97)00092-7.

**Ibragic, S., & Sofić, E. (2015).** Chemical composition of various *Ephedra* species. *Bosnian journal of basic medical sciences*, 15(3), 21-27. Doi: 10.17305/bjbms.2015.539.

**Imeh, U., & Khokhar, S. (2002).** Distribution of conjugated and free phenols in fruits: antioxidant activity and cultivar variations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6301-6306. Doi: org/10.1021/jf020342j.

**Ingle, P.V., & Patel, D.M. (2011).** C-reactive protein in various disease condition—an overview. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 4(1), 9-13.

**Ioannidis, I. (2008).** The road from obesity to type 2 diabetes. *Angiology*, 59(2 Suppl), 39S-43S. Doi: 10.1177/0003319708318583.

**Ionuț, I., Olteanu, D., Marc, G., Clichici, S., Benedec, D., Tipericiu, B., & Oniga, O. (2018).** Antioxidant activity evaluation for some novel chromenyl-derivatives. *Farmacia*, 66(3), 416-420. Doi: 10.31925/farmacia.2018.3.5.

**Ismail, A., Marjan, Z. M., & Foong, C. W. (2004).** Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chemistry*, 87(4), 581-586. Doi: org/10.1016/j.foodchem.2004.01.010

**Jagadeeswar, R.R., Tiwari, A.K., Kumar, U.S., Reddy, S.U., Ali, A.Z., & Rao, T.M. (2003).** Novel-3-o-acyl mesquite analogues as free radical scavengers and enzyme inhibitors; synthesis, biological evaluation and structure-activity relationship. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 13(16), 2777-2780. Doi: 10.1016/s0960-894x(03)00494-3.

**Jaradat, N., Hussien, F., & Al-Ali, A. (2015).** Preliminary phytochemical screening, quantitative estimation of total flavonoids, total phenols and antioxidant activity of *Ephedra alata* Decne. *Journal of Materials and Environmental Science*, 6(6), 1771-1778.

**Jayaraj, S., Suresh, S., & Kadeppagari, R.K. (2013).** Amylase inhibitors and their biomedical applications, *Starch*, 65 (7-8), 535-542. Doi: org/10.1002/star.201200194.

**Jiang, M., & Zhang, H. (2016).** Engineering the shikimate pathway for biosynthesis of molecules with pharmaceutical activities in *E. coli*. *Current Opinion Biotechnology*, 42, 1-6. Doi: org/10.1016/j.copbio.2016.01.016.

**Jin, L., Xue, H.Y., Jin, L.J., Li, S.Y., & Xu, Y.P. (2008).** Antioxidant and pancreas protective effect of aucubin on rats with streptozotocin-induced diabetes. *European Journal of Pharmacology*. 582(1-3), 162-167. Doi: 10.1016/j.ejphar.2007.12.011.

**Joshi, S.R.E., Standl, E., Tong, N., Shah, P., Kalra, S., & Rathod, R. (2015).** Therapeutic potential of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors in type 2 diabetes mellitus: an evidence-

based review. *Expert opinion on pharmacotherap*, 16(13), 1959-1981. Doi: 10.1517/14656566.2015.1070827.

**Kacema, N., Roumyb, V., Duhalc, N., Merouaned, F., Neute, C., Christenf, P., Hostettmannf, K., Rhouati, S. (2016).** Chemical composition of the essential oil from Algerian *Genistaquadriflora Munby* and determination of its antibacterial and antifungal activities. *Industrial Crops and Products*, 90, 87-93.

**Kadhun, A.A.H., Al-Amiery, A.A., Musa, A.Y., & Mohamad, A.B. (2011).** The antioxidant activity of new coumarin derivatives. *International journal of molecular sciences*, 12(9), 5747-5761. Doi: 10.3390/ijms12095747.

**Kakiuchi, N., Inoue, K., Kurita, Y., Ohkubo, K., Tsuda, Y., & M. Mikage. (2007).** Survey of *Ephedra* resources in the Northern areas of Pakistan and their genetic diversity, *Journal of Natural Medicines*, 61(3), 357-365. Doi: 10.1007/s11418-007-0134-y.

**Kallassy, H., Fayyadkazan, M., Makki, R., EL-Makhour, Y., Rammal, H., Leger, D.Y., Sol, V., Fayyad-Kazan, H., Liagre, H., & Badran, B. (2017).** Chemical composition and antioxidant, anti-inflammatory, and antiproliferative activities of Lebanese *Ephedra campylopoda* plant. *Medical science monitor basic research*, 23, 270-284. Doi: 10.12659/MSMBR.905056.

**Kartal, N., Sokmen, M., Tepe, B.D., Polissiou, M., & Sokmen, A. (2007).** Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chemistry*, 100(2), 584-589. Doi: org/10.1016/j.foodchem.2005.09.084.

**Karthik, K., Kumar, B.R.P., Priya, V.R., Kumar, S.K., & Rathore, R.S.B. (2013).** Evaluation of anti-inflammatory activity of *Canthium parviflorum* by *in-vitro* method. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology*, 1(5), 729-731.

**Khaled, R. (2021).** Phytochemical and biological activities of *Ephedra alata*: a review. *International journal of science inventions today*, 2021, 10(3), 175-178.

**Khalil, A.M.A., Hassan, S.E.-D., Alsharif, S.M., Eid, A.M., Ewais, E.E.-D., Azab, E., Gobouri, A.A., Elkelish, A., Fouda, A. (2021).** Isolation and Characterization of Fungal Endophytes Isolated from Medicinal Plant *Ephedra pachyclada* as Plant Growth-Promoting. *Biomolecules*, 11, 140. Doi : org/10.3390/ biom11020140.

**Khan, A., Gul, J., Khan, A., Gul, J.F., Bahadur, A., & Danish, M. (2017).** *In vitro* antioxidant and antimicrobial activities of *Ephedra gerardiana* (Root and Stem) crude extract

and fractions. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2017, 1-6. Doi: org/10.1155/2017/4040254.

**Khan, R.A., Khan, M.R., & Sahreen, S. (2012).** Assessment of flavonoids contents and *in vitro* antioxidant activity of *Launaea procumbens*. *Chemistry Central Journal volume*, 6(43), 1-11. Doi: org/10.1186/1752-153X-6-43.

**Kiliç S & Yeşiloğlu Y. (2013).** Spectroscopic studies on the antioxidant activity of *p*-coumaric acid. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 115, 719-724. Doi: 10.1016/j.saa.2013.06.110.

**Kim, B.S., Song, M.Y., & Kim, H. (2014).** The anti-obesity effect of *Ephedra sinica* through modulation of gut microbiota in obese Korean women. *Journal of Ethnopharmacology*, 152(2), 532-539. Doi: 10.1016/j.jep.2014.01.038.

**Kim, J., Jang, D.S., Kim, H., & Kim, J.S., (2009).** Anti-lipase and lipolytic activities of ursolic acid isolated from the roots of *Actinidia arguta*. *Archives of pharmacal research*, 32(7), 983-987. Doi: 10.1007/s12272-009-1702-3.

**Klervi, L.L. (2005).** Connaissance chimiotaxonomique du genre *Turbinaria* et étude des composés de défense de différents espèces de *Sargassacées* des Iles Salmon (Pacific sud). P : 210.

**Konkon, N.G., Simaga, D., & Adjoungova, A.L. (2006).** Etude phytochimique de *Mitragyna inermis* (Willd.) O. Ktze (Rubiaceae), plante à feuille antidiabétique. *Pharmacopée et médecine traditionnelle africaine*, 14, 73-80.

**Kovalchuk, H., Lupak, O., Klepach, H., & Polyuzhyn, I. (2019).** Potentiometric determination of the antioxidant activity of medicinal plants. *Scientific Journal of Polonia University*, 35(4), 102-109. Doi: 10.23856/3512.

**Kumagai, S., Jikimoto, T., & Saegusa, J., (2003).** Pathological roles of oxidative stress in autoimmune diseases. *Rinsho byori, the Japanese Journal of Clinical Pathology*, 51(2), 126-132.

**Kumar, G. P., & Singh S. B. (2011).** Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extracts from trans Himalayan medicinal plants. *European Journal of Applied Sciences*, 3(2), 53-57.

**Kumar, V., Abul, K. A., Nelson, F., & Richard, M. (2007).** Robbins Basic Pathology. Elsevier Health Sciences. 8th Edition, p: 20-60.

**Kuskoski, E.M., Asuero, A.G., Troncoso, A.M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005).** Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25(4), 726-732. Doi :org/10.1590/S0101-20612005000400016.

**Kwon, Y.B., Lee, J.D., Lee, H.J., Han, H.J., Mar, W.C., Kang, S.K., & Lee, J.H. (2001).** Bee venom injection into an acupuncture point reduces arthritis associated edema and nociceptive responses. *Pain*, 90(3), 271-280. Doi: 10.1016/s0304-3959(00)00412-7.

**Kwon, Y.I., Vattem, D.A., & Shetty, K. (2007b).** Evaluation of clonal herbs of *Lamiaceae* species for management of diabetes and hypertension. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 15(1), 107-118.

**Kwon, Y.I., Apostolidis, E., Kim, Y.C., & Shetty, K. (2007a).** Health benefits of traditional corn, beans, and pumpkin: *in vitro* studies for hyperglycemia and hypertension management. *Journal of Medicinal Food*, 10(2), 266-275. Doi: 10.1089/jmf.2006.234.

**Lafuente, A., Guillamon, E., Villares, A., Rostagno, M.A., & Martinez, J.A., (2009).** Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammation Research review*, 58(9), 537-552. Doi: 10.1007/s00011-009-0037-3.

**Lamien-Meda, A., Lamien, C.E., Compaore, M.M., Meda, R.N., Kiendrebeogo, M., Zeba, B., Millogo, J.F., & Nacoulma, D.G. (2008).** Polyphenol content and antioxidant activity of fourteen wild edible fruit from Burkina Faso. *Molecules*, 13(3), 581-594. Doi: 10.3390/molecules13030581.

**Lee, C.H., & Lee, H.S. (2009).** Growth inhibiting activity of quinaldic acid isolated from *Ephedra pachyclada* against intestinal bacteria. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 52(4), 331-335. Doi: org/10.3839/jksabc.2009.059.

**Lee, E.Y., Kaneko, S., Jutabha, P. (2015).** Distinct action of the-glucosidase inhibitor miglitol on SGLT3, enteroendocrine cells, and GLP1 secretion, *Journal of Endocrinology*, 224(3), 205-214.

**Lee, M.R. (2011).** The history of *Ephedra* (Ma-Huang). *The journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh Edinb*, 41(1), 78-84. Doi: 10.4997/JRCPE.2011.116.

**Lee, Y.J., & Lee, M.J. (2005).** The efficiency of *Ephedrae* Herba on the obese Zucker rat's lipid of blood serum and fatty acid metabolism of skeletal muscles. *Journal of oriental rehabilitation medicine*, 15(3), 99-111.

- Lewandowska, U., Szewczyk, K., Hrabec, E., Janecka, A., & Gorlach, S. (2013).** Overview of metabolism and bioavailability enhancement of polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(50), 12183-12199. Doi: 10.1021/jf404439b.
- Li, H.B., Cheng, K.W., Wong, C.C., Fan, K.W., Chen, F., & Tian, Y. (2007).** Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae. *Food Chemistry*, *102*(3), 771-776. Doi: org/10.1016/j.foodchem.2006.06.022.
- Li, X., Fang, P., Mai, J., & Choi. (2013).** Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *Journal of Hematology and Oncology*, *6*, 1-19. Doi: 10.1186/1756-8722-6-19.
- Li, Y., Wen, S., Kota, B.P., Peng, G., Li, G.Q., Yamahara, J., & Roufogalis, B.D. (2005).** *Punica granatum* flower extract, a potent alpha-glucosidase inhibitor, improves postprandial hyperglycemia in Zucker diabetic fatty rats. *Journal of Ethnopharmacology*, *99*(2), 239-244. Doi: 10.1016/j.jep.2005.02.030
- Liu, H., Mou, Y., Zhao, J., Wang, J., Zhou, L., Wang, W.D., Han, J., Yu, Z., & Yang, F. (2010).** Flavonoids from *Halostachys caspica* and their antimicrobial and antioxidant activities. *Molecules*, *15*(11), 7933-7945. Doi: 10.3390/molecules15117933.
- Liu, Q., & Yao, H. (2007).** Antioxidant activities of barley seeds extracts. *Food Chemistry*, *102*(3), 732-737. Doi: 10.1016/j.foodchem.2006.06.051.
- Liyana-Pathriana, C.M., & Shahidi, F. (2006).** Antioxydant properties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivum* L.) and their milling fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *86*(3), 477-485. Doi: org/10.1002/jsfa.2374.
- Llorent-Martínez, E.J., Gouveia, S., Castilho, P.C. (2015).** Analysis of phenolic compounds in leaves from endemic trees from Madeira Island. A contribution to the chemotaxonomy of *Laurisilva* forest species. *Industrial Crops and Products*, *64*, 135-151. Doi: org/10.1016/j.indcrop.2014.10.068
- Lowe, M.E. (2002).** The triglyceride lipases of the pancreas. *Journal of Lipid Research*, *43*(12), 2007-2016. Doi: 10.1194/jlr.r200012-jlr200.
- Lu, Y., & Foo, L.Y. (2001).** Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry*, *75*(2), 197-202. Doi: 10.1016/S0308-8146(01)00198-4
- Lucas-Gonzalez, R., Navarro-Coves, S., Pérez-Álvarez, J.A., Fernández-López, J., Muñoz, L.A., & Viuda-Martos, M. (2016).** Assessment of polyphenolic profile stability and

changes in the antioxidant potential of maqui berry (*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz) during in vitro gastrointestinal digestion. *Industrial Crops and Products*, 94, 774-782. Doi: org/10.1016/j.indcrop.2016.09.057.

**Macheix, J.J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, p : 4-5.

**Mahattanatawee, K., Manthey, J.A., Luzio, G., Talcott, S.T., Goodner, K., & Baldwin, E.A. (2006).** Total antioxidant activity and fiber content of select Florida-grown tropical fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(19), 7355-7363. Doi: 10.1021/jf060566s.

**Mahdavi, M.Z., Moshafi, M.H., & Forotanfar, H. (2010).** Antimicrobial effects of methanol extracts of 12 herbal species on 6 bacterial strains using cylinder-plate method. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*, 8(3), 227-237.

**Maire, R. (1952).** Flore de l'Afrique du Nord (Maroc, Algérie, Tunisie, Tripolitaine, Cyrénaïque Et Sahara) (Ed), Vol. 1. Le chevalier, Paris.

**Maisuthisakul, P., Pasuk, S., & Ritthiruangdej, P. (2008).** Relationship of antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(3), 229-240. Doi: org/10.1016/j.jfca.2007.11.005.

**Malgalhae, L.M., Segundo, M.A., Reis, S., & Lima, J. (2008).** Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chemical Acta*, 613(1), 1-19. Doi: 10.1016/j.aca.2008.02.047.

**Malinda, K., Hery, S., & Akhmad, D. (2017).** Characterization and antioxidant activity of gallic acid derivative. *American Institute of Physics*, 1904(1), 020030-1-020030-7. Doi: org/10.1063/1.5011887.

**Marimuthu, P., Wu, C.L., Chang, H.T., & Chang, S.T. (2008).** Antioxidant activity of the ethanolic extract from the bark of *Chamaecyparis obtusa* var. *formosana*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(8), 1400-1405. Doi: org/10.1002/jsfa.3231.

**Marnett, L.J. (1999).** Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research*, 424(1-2), 83-95. Doi: 10.1016/s0027-5107(99)00010-x.

**Martinez-Gonzalez, A.I., Alvarez-Parrilla, E., Díaz-Sánchez Á.G., De la Rosa, L.A., Núñez-Gastélum, J.A., Vazquez-Flores A.A., & Gonzalez-Aguilar, G.A. (2017a).** *In*

*in vitro* inhibition of pancreatic lipase by polyphenols: a kinetic, fluorescence spectroscopy and molecular docking study. *Food technology and biotechnology*, 55(4), 519-530. Doi: 10.17113/ftb.55.04.17.5138.

**Martinez-Gonzalez, A.I., Diaz-Sanchez, A.G., de la Rosa, L.A., Vargas-Requena, C.L., Bustos-Jaimes, I., & Alvarez-Parrilla, E. (2017b).** Polyphenolic compounds and digestive enzymes: *in vitro* non-covalent interactions. *Molecules*, 22(4), 669-692. Doi: 10.3390/molecules22040669.

**Matkowski, A. (2008).** Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants. *Biotechnology Advances*, 26(6), 548-560. Doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.07.001.

**McCue, P., Vатtem, D., & Shetty, K. (2004).** Inhibitory effect of clonal *oregano* extracts against porcine pancreatic amylase *in vitro*. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*; 13(4), 401-408.

**McDougall, G. J., Kulkarni, N. N., & Stewart, D. (2009).** Berry polyphenols inhibit pancreatic lipase activity *in vitro*. *Food Chemistry*, 115(1), 193-199. Doi: 10.1016/j.foodchem.2008.11.093.

**Mehta, J.L., Rasouli, N., Sinha, A.K., Molavi, B. (2006).** Oxidative stress in diabetes: a mechanistic overview of its effects on atherogenesis and myocardial dysfunction. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 38(5-6), 794-803. Doi: 10.1016/j.biocel.2005.12.008.

**Melov, S., Ravenscroft, J., & Malik S. (2000).** Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Science*, 289(5484), 1567-1569. Doi: 10.1126/science.289.5484.1567.

**Miao, M., Jiang, B., Jiang, H., Zhang, T., & Li, X. (2015).** Interaction mechanism between green tea extract and human  $\alpha$ -amylase for reducing starch digestion, *Food Chemistry*, 186(1), 20-25. Doi: org/10.1016/j.foodchem.2015.02.049.

**Miara, M.D., Teixidor-Toneu, I., Sahnoun, T., Bendif, H., Ait Hammou, M. (2019).** Herbal remedies and traditional knowledge of the Tuareg community in the region of Illizi (Algerian Sahara). *Journal of Arid Environments*, 167, 65-73. Doi: org/ 10. 1016/j. jarid env. 2019. 04. 020.

**Mi-Jung, Y., Han-Chang, L., Gun-Ho, K., Hye-Jung L., Insop, S., Seung-Kyu, O., Sung-Keel, K., & Dae-Hyun, H. (2006).** Anti-arthritic Effects of *Ephedra sinica* STAPF

Herb-Acupuncture: Inhibition of Lipopolysaccharide-Induced Inflammation and Adjuvant-Induced Polyarthritis. *Journal of pharmacological sciences*, 100(1), 41-50. Doi: 10.1254/jphs.fp0050637.

**Miraliakbari, H., & Shahidi, F. (2008).** Antioxidant activity of minor components of tree nut oils. *Food Chemistry*, 111(2), 421-427. Doi: 10.1016/j.foodchem.2008.04.008.

**Mohamed, G.A., & Alliuocide, G. (2008).** A new flavonoid with potent  $\alpha$ -amylase inhibitory activity from *Allium cepa* L. *Archive for Organic Chemistry*, 2008(11), 202-209. Doi: org/10.3998/ark.5550190.0009.b20

**Mokdad, A.H., Ford, E.S., Bowman, B.A., Dietz, W.H., Vinicor, F., & Bales, V.S. (2003).** Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors. *Journal of the american medical association*, 289(1), 76-79. Doi: 10.1001/jama.289.1.76.

**Mopuri, R., Ganjayi, M., Meriga, B., Koorbanally, N.A., & Islam, M.S. (2018).** The effects of *Ficus carica* on the activity of enzymes related to metabolic syndrome. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(1), 201-210. Doi: org/10.1016/j.jfda.2017.03.001.

**Moreno, D.A., Ilic, N., Poulev, A., Brasaemle, D.L., Fried, S.K., & Raskin, I. (2003).** Inhibitory effects of grape seed extract on lipases. *Nutrition*, 19(10), 876-879. Doi: 10.1016/S0899-9007(03)00167-9.

**Morikawa, T., Muraoka, O., & Yoshikawa, M. (2010).** Pharmaceutical food science; search for anti-obese constituents from the flowers of *Bellis perennis*, *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 130(5), 673-678. Doi: 10.1248/yakushi.130.673.

**Motomura, H., Noshiro, S., & Mikage, M. (2007).** Variable wood formation and adaptation to the alpine environment of *Ephedra pachyclada* (Gnetales: Ephedraceae) in the Mustang district, Western Nepal. *Annals of Botany*, 100(2), 315-324. Doi:10.1093/aob/mcm111.

**Mrabti, H.N., Jaradat, N., Kachmar, M.R., Ed-Dra, A., Ouahbi, A., Cherrah, Y., & MoulayEl Abbes, F. (2019).** Integrative herbal treatments of diabetes in Beni Mellal region of Morocco. *Journal of Integrative Medicine*, 17(2), 93-99. Doi: org/10.1016/j.joim.2019.01.001.

**Mukherjee, M. (2003).** Human digestive and metabolic lipases-a brief review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 22(2-5), 369-376. Doi: 10.1016/S1381-1177(03)00052-3.

**Mutiu, K., Jesuyon, V.O., & Anofi, O.T.A. (2013).** *In vitro* studies on the inhibition of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase by leaf extracts of *Picralima nitida* (Stapf). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* October, 12(5), 719-725. Doi: 10.4314/tjpr.v12i5.9.

**Nabavi, S. M., Šamec, D., Tomczyk, M., Milella L., & Russo, D., Habtemariam, S., Suntar, I., Rastrelli, L., Daglia, M., Xiao, J., Giampieri, F., Battino, M., Sobarzo-Sanchez, E., Nabavi, S.F., Yousefi, B., Jeandet, P., Xu, S., Shirooie, S. (2020).** Flavonoid biosynthetic pathways in plants: Versatile targets for metabolic engineering, *Biotechnology advances*, 38, 107316. Doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.005.

**Namazi, M.R. (2007).** Neurogenic dysregulation, oxidative stress, autoimmunity, and melanocytorrhagy in vitiligo: can they be interconnected?. *Pigment Cell & Melanoma Research*. 20(5), 360-363. Doi: 10.1111/j.1600-0749.2007.00408.x.

**Narita, Y., & Inouye, K. (2011).** Inhibitory effects of chlorogenic acids from green coffee beans and cinnamate derivatives on the activity of porcine pancreas  $\alpha$ -amylase isozyme I. *Food Chemistry*. 127(4), 1532-1539. Doi: org/10.1016/j.foodchem.2011.02.013.

**Natarajan, D., Britto, S. J., Srinivasan, K., Nagamurugan, N., Mohanasundari, C., & Perumal, G. (2005).** Antibacterial activity of *Euphorbia fusiformis*-A rare medicinal herb. *Journal of Ethnopharmacology*, 102(1), 123-126. Doi: org/10.1016/j.jep.2005.04.023.

**Nawwar, M.A., El-Sissi, H.I., & Barakat, H.H. (1984).** Flavonoid constituents of *Ephedra alata*. *Phytochemistry*, 23(12), 2937-2939. Doi: org/10.1016/0031-9422(84)83045-9.

**Negri, G., Tabach, R. (2013).** Saponins, tannins and flavonols found in hydroethanolic extract from *Periandra dulcis* roots. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23, 851-860. Doi : org/10.1590/S0102-695X2013000600001.

**Nicolas, J., Cousin, F., & Thivolet, J. (2001).** Immunologie clinique et allergologie. Aspirine et AINS : intolérance et allergie. John Libbey Eurotext: p. 55-58.

**Nowick, E. (2014).** Historical common names of great plains plants, Index: Scientific Names Index (vol. 2), p. 161.

**O'Dowd, N.A., McCauley, P., Wilson, G., Parnell, J., Kavanagh, T.A.K., & McConnell, D. (1998).** *Ephedra* species: *in vitro* Culture, Micropropagation, and the Production of Ephedrine and Other Alkaloids. Medicinal and Aromatic Plants X. Biotechnology in Agriculture and Forestry, (vol 41). Springer, Berlin, Heidelberg. P.154-193. Doi: org/10.1007/978-3-642-58833-4\_10.

**Olatunde, F.E., Ogundipe, O.O., Uhunwangho, E.S., Adeyanju, M.A., & Moody, J.O. (2003).** Antioxidant properties of extracts from *Alchornea laxiflora* (Benth) Pax and Hoffman. *Phytotherapy Research*, 17(7), 713-716. Doi: 10.1002/ptr.1050.

**Othman, A., Ismail, A., Ghani, N.A., & Adenan, I. (2007).** Antioxidant capacity and phenolic content of *cocoa* beans. *Food Chemistry*, 100(4), 1523-1530. Doi: 10.1016/j.foodchem.2005.12.021.

**Ould El Hadj, M.D., Hadj-Mahammed, M., & Zabeirou, H. (2003).** Place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région d'Ouargla (sahara septentrional est). *Courrier du savoir*, 3, 47-51.

**Oyaizu, M. (1986).** Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44, 307-315. Doi: 10.5264/eiyogakuzashi.44.307.

**Ozenda, P. (1991).** Flore et végétation du Sahara. Centre national de la recherche scientifique, p : 662.

**Park, J.M., Kim, H.J., Kim, J.A., Kim, S.J., & Ko, B.P. (2005).** The effects of *Evodia rutaecarpa* and *Ephedra Sinica* on the resting metabolic rate and body composition of obese women on a low-calorie diet: a double-blinded randomized controlled clinical trial. *Journal of Korean Medical Science*, 26(3), 249-262.

**Park, K.M., Lim, H.H., & Song, Y.K. (2012).** Anti-inflammation and anti-obesity effects of Euiiin-tang granules on high fat diet-induced obese C57BL/6 J mice. *Chinese Journal of Rehabilitation Medicine*, 22(2), 47-66.

**Park, M., Cho, H., Jung, H., Lee, H., & Hwang, K.T. (2014).** Antioxidant and anti-inflammatory activities of tannin fraction of the extract from black raspberry seeds compared to grape seeds. *Journal of Food Biochemistry*, 38(3), 259-270. Doi: org/10.1111/jfbc.12044.

**Parsaeimehr, A., Sargsyan, E., & Javidnia, K. (2010).** A comparative study of the antibacterial, antifungal and antioxidant activity and total content of phenolic compounds of cell cultures and wild plants of three endemic species of *Ephedra*. *Molecules*, 15(3), 1668-1678. Doi:10.3390/molecules15031668.

**Patil, V.M., & Masand, N. (2018).** Anticancer potential of flavonoids: chemistry, biological activities, and future perspectives. *Studies in Natural Products Chemistry*, 59, 401-430. Doi: org/10.1016/B978-0-444-64179-3.00012-8.

**Pavan, V., Sancho, R. A. S., & Pastore, G. (2014).** The effect of *in vitro* digestion on the antioxidant activity of fruit extracts (*Carica papaya*, *Artocarpus heterophyllus* and *Annona marcgravii*). *LWT-Food Science and Technology*, 59(2), 1247-1251. Doi: org/10.1016/j.lwt.2014.05.040.

**Peng, F., Wan, F., Xiong, L., Peng, C., Dai, M., & Chen, J. (2014).** *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of Pogostone. *Chinese Medical Journal*. 127(23), 4001-4005.

**Phatak, R.S., & Hendre, A.S. (2014).** Total antioxidant capacity (TAC) of fresh leaves of *Kalanchoe pinnata*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(5), 32-35.

**Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., & Defraigne, J.O. (2002).** Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16(4), 233-239. Doi: org/10.1016/S0985-0562(02)00166-8.

**Pincemail, J., Cillard, J., Neve, J., & Defraigne, J.O. (2014).** Mesure de la capacité antioxydante globale du plasma : une revue critique. *Annales de biologie clinique*, 72(4), 413-421. Doi:10.1684/abc.2014.0971.

**Pinto, M.D.S., Ranilla, L.G., Apostolidis, E., Lajolo, F.M., Genovese, M.I., & Shetty, K. (2009).** Evaluation of anti-hyperglycemia and antihypertension potential of native Peruvian fruits using *in vitro* models. *Journal of medicinal food*, 12(2), 278-291. Doi: 10.1089/jmf.2008.0113.

**Pirbalouti, G. A., Azizi, S., Amirmohammadi, M., & Craker, L. (2013).** Healing effect of hydro-alcoholic extract of *Ephedra pachyclada* Boiss. in experimental gastric ulcer in rat. *Acta poloniae pharmaceutica*, 70(6), 1003- 1009.

**Plaper, A., Golob, M., Hafner, I., Oblak, M., Solmajer, T., & Jerala, R. (2003).** Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochemical and biophysical research communications*. 306(2), 530-536. Doi: 10.1016/s0006-291x (03)01006-4.

**Popović, B.M., Štajner, D., Slavko, K., & Sandra, B. (2012).** Antioxidant capacity of cornelian cherry (*Cornus mas* L.)—Comparison between permanganate reducing antioxidant capacity and other antioxidant methods. *Food Chemistry*, 134(2), 734-741. Doi:10.1016/j.foodchem.2012.02.170.

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

**Prakash, D., Upadhyay, G., Singh, B. N., & Singh, H. B. (2007).** Antioxidant and free radical-scavenging activities of seeds and agri-wastes of some varieties of soybean (*Glycine max*). *Food Chemistry*, 104(2), 783-790.

**Prescott, L., Harley, J., & Klein, D. (2003).** Microbiologie. Ed. De Boek université.

**Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999).** Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269(2), 337-341. Doi: 10.1006/abio.1999.4019.

**Prior R.L., Wu. X., & Schaich, K. (2005).** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290-4302. Doi: 10.1021/jf0502698.

**Psarra, E., Makris, D.P., Kallithraka, S., & Kefalas, P. (2002).** Evaluation of the antiradical and reducing properties of selected Greek white wines: correlation with polyphenolic composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(9), 1014-1020. Doi: 10.1002/jsfa.1124.

**Quezel, P., & Santa, S. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. *Centre National de la Recherche Scientifique*, Ed, Paris: 1170 p.

**Rached, W., Benamar, H., Bennaceur, M., & Marouf, A. (2010).** Screening of the antioxidant potential of some Algerian indigenous plants. *Journal of biological sciences*, 10(4), 316-324. Doi :10.3923/jbs.2020.316.324.

**Rahman, H., Eswaraiah, M.C., & Dutta, A.M., (2015).** *In-vitro* anti-inflammatory and anti-arthritic activity of *Oryza sativa* Var. joha rice (an aromatic indigenous rice of assam). *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 15(1), 115-121. Doi: 10.5829/idosi.aejaes.2015.115.121.

**Rahman, K. (2007).** Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical. Interentions in Aging*, 2(2), 219-236.

**Ramkumar, K.M., Thayumanavan, B., Palvannan, T., & Rajaguru, P. (2009).** Inhibitory effect of *Gymnema montanum* leaves on  $\alpha$ -glucosidase activity and  $\alpha$ -amylase activity and their relationship with polyphenolic content. *Medicinal Chemistry Research*, 19(8), 948-961. Doi:10.1007/s00044-009-9241-5.

**Rao, S.A., Srinivas, P.V., Tiwari, A.K., Vanka, U.M., Rao, R.V., Dasari, K.R., & Rao, M.J. (2007).** Isolation, characterization and chemobiological quantification of alpha-glucosidase enzyme inhibitory and free radical scavenging constituents from *Derris scandens* Benth. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 855(2), 166-172. Doi: 10.1016/j.jchromb.2007.04.048.

**Reddy, C.V.K., Sreeramulu, D., & Raghunath, M. (2010).** Antioxidant activity of fresh and dry fruits commonly consumed in India. *Food Research International*, 43(1), 285-288. Doi: 10.1016/j.foodres.2009.10.006.

**Rodríguez, H., Curiel, J.A., Landete, J.M., De las Rivas, B., López de Felipe, F., Gómez-Cordovés, C., Mancheño, J.M., & Muñoz, R. (2009).** Food phenolics and lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 132(2-3), 79-90. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.025.

**Romanová, D., Vachálková, A., Cipák, L., Ovesná, Z., & Rauko, P. (2001).** Study of antioxidant effect of apigenin, luteolin and quercetin by DNA protective method. *Neoplasma*, 48(2), 104-107.

**Roriz, C.L., Barros, L., Carvalho, A.M., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C. (2015).** Scientific validation of synergistic antioxidant effects in commercialised mixtures of *Cymbopogon citratus* and *Pterospartum tridentatum* or *Gomphrena globosa* for infusions preparation. *Food Chemistry*, 185, 16-24. Doi: org/10.1016/j.foodchem.2015.03.136.

**Rousselet, M.C., Vignaud, J.M., Hofman, P., & Chatelet, F.P. (2005).** Inflammation et pathologie inflammatoire. *Association Française des Enseignants en Cytologie et Anatomie Pathologiques*, p. 4-7.

**Ruch, R.J., Cheng, S.J., & Klaunig, J.E. (1989).** Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*, 10(6), 1003-1008. Doi: 10.1093/carcin/10.6.1003.

**Rufino M.M., Alves, R.E., Brito, E.S., Jiménez, J.P., Calixto, F.S., & Filho, J.M. (2010).** Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 121(4), 996-1002. Doi:10.1016/j.foodchem.2010.01.037.

**Rustaiyan, A., Javidnia, K., Farjam, M.H., Aboee-Mehrizi, F., & Ezzatzadeh, E. (2011a).** Antimicrobial and antioxidant activity of the *Ephedra sarcocarpa* growing in Iran. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(17), 4251-4255. Doi: 10.5897/JMPR.9000172.

**Rustaiyan, A., Javidnia, K., Farjam, M.H., Mohammadi, M.K., & Mohammadi, N. (2011b).** Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of the methanolic extracts of *Ephedra laristanica*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(24), 5713-5717. Doi: 10.5897/JMPR.9001251.

**Saeed, N., Khan, R.M & Shabbir, M. (2012).** Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12, 221-233. Doi.org/10.1186/1472-6882-12-221.

**Salhi, S., Fadli, M., Zidane, L., & Douira, A. (2010).** Etudes floristique et ethnobotanique des plantes médicinales de la ville de Kénitra (Maroc). *Lazaroa*, 31, 133-146. Doi:10.5209/rev\_LAZA.2010.v31.9.

**Sanchez-Moreno, C. (2002).** Method used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8(3), 121-137. Doi: org/10.1106/108201302026770.

**Sangeetha, G., & Vidhya, R. (2016).** In vitro anti-inflammatory activity of different parts of *Pedaliium murex* (L.). *International Journal of Herbal Medicine*, 4(3), 31-36.

**Santos, E.L., Maia, B., Ferriani A.P., & Teixeira S.D. (2017).** Flavonoids: classification, biosynthesis and chemical ecology, in flavonoids-from biosynthesis to human health, *Open Science Open Minds*, 10, 5772-67861. Doi:10.5772/67861.

**Sasikumar, V., Subramaniam, A., Aneesh, A., & Saravanan, G. (2015).** Protective effect of alkaloids from amaranthus *Viridis linn.* against hydrogen peroxide induced oxidative damage in human erythrocytes (rbc). *International Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1(1), 49-53. Doi: org/10.17352/ijcem.000011

**Scazzocchio, F., D'Auria, F.D., Alessandrini, D., & Pantanella, F. (2006).** Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiological Research*, 161(4), 327-333. Doi: org/10.1016/j.micres.2005.12.003.

**Schofield, P., Mbugua, D.M., & Pell, A.N. (2001).** Analyses of condensed tannins. *Animal Feed Science and Technology journal*, 91(1-2), 21-40. Doi: org/10.1016/S0377-8401(01)00228-0.

**Schulman, S. (2003).** Addressing the potential risks associated with *Ephedra* Use: a review of recent efforts. *Public Health Reports*, 118(6), 487-492. Doi: 10.1093/phr/118.6.487.

**Schulz, E., Anter, E., & Keane, J.P. (2004).** Oxidative stress, antioxidants, and endothelial function. *Current Medicinal Chemistry*, 11(9), 1093-1104. Doi: 10.2174/0929867043365369.

**Seifried, H.E., Anderson, D.E., Fisher, E.I., & Milner, J.A. (2007).** A review of the interaction among the dietary antioxidants and reactive oxygen species. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(9), 567-579. Doi: org/10.1016/j.jnutbio.2006.10.007.

**Sergent, T., Vanderstraeten, J., Winand, J., Beguin, P., & Schneider, Y.J. (2012).** Phenolic compounds and plant extracts as potential natural anti-obesity substances. *Food chemistry*, 135(1), 68-73. Doi: 10.1016/j.foodchem.2012.04.074.

**Shahwar, D., & Raza, M.A. (2012).** Antioxidant potential of phenolic extracts of *Mimusops elengi*. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 2(7), 547-550. Doi: 10.1016/S2221-1691(12)60094-X.

**Shan, B., Cai, Y.Z., Brooks, G.D., & Cokk, H. (2007).** The *in vitro* antibacterial activity of dietary spiece and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, 117,112-119. Doi: org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2007.0

**Shekelle, P.G., Hardy, M.L., Morton, S.C., Maglione, M., Mojica, W.A., Suttorp, M.J., Rhodes, S.L., Jungvig, L., & Gagné, J. (2003).** Efficacy and safety of *Ephedra* and ephedrine for weight loss and athletic performance: a meta-analysis. *Journal of the American Medical Association*, 289(12), 1537-1545. Doi: 10.1001/jama.289.12.1537

**Shinde, A., Ganu, J., & Naik, P. (2012).** Effect of free radicals & antioxidants on oxidative stress. *Journal of Dental and Allied Sciences*, 1(2), 63-66. Doi: 10.4103/2277-4696.159144.

**Shon, M.Y., Kim, T.H., & Sung, N.J. (2003).** Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (*Phellinus* of Hymenochaetaceae) extracts. *Food chemistry*, 82(4), 593-597. Doi:10.1016/S0308-8146(03)00015-3

**Shravan, K.N., Kishore, G., Siva, K.G., & Sindhu, P. (2011).** *In vitro* anti-inflammatory and anti-arthritic activity of leaves of *Physalis angulata* L. *International journal of pharmacy and industrial research*, 1(3), 211-213.

**Shumaila, J., Khan, M.R., Rashid, U., & Bokhari, J. (2013).** Assessment of antioxidant potential, total phenolics and flavonoids of different solvent fractions of

monothea *buxifolia* fruit. *Osong public health and research perspectives*, 4(5), 246-254. Doi: 10.1016/j.phrp.2013.09.003.

**Sies, H. (1997).** Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82(2), 291-295. Doi: org/10.1113/expphysiol.1997.sp004024.

**Silva, E.M., Souza, J.N.S., Rogez, H., Rees, J.F., & Larondelle, Y. (2007).** Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chemistry*, 101(3), 1012-1018. Doi: org/10.1016/j.foodchem.2006.02.055.

**Simić, A., Manojlović, D., Šegan, D., Todorović, M. (2007).** Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics. *Molecules*, 12(10), 2327-2340. Doi: 10.3390/12102327.

**Soeken, K.L., Miller, S.A., & Ernst, E. (2003).** Herbal Medicines for the treatment of rheumatoid arthritis: a systematic review. *Rheumatology*, 42(5), 652-659. 42(5):652-9. Doi: 10.1093/rheumatology/keg183.

**Soharb, M.H., Rahman, M.E., Hassan, C.M., & Rashid, M.A. (2001).** Antibacterial activity of *Claussena heotaphylla*. *Fitoterapia*, 72, 547-549.

**Sokol-Letowska, A., Oszmianski, J., & wojdylo, A. (2007).** Antioxydant activity of the phenolic compounds of Hawthorn, pine and skullcap. *Food chemistry*, 103(3), 853-859. Doi: org/10.1016/j.foodchem.2006.09.036.

**Song, F.L., Gan, R.Y., Zhang, Y., Xiao, Q., Kuang, L., & Li, H.B. (2010).** Total phenolic contents and antioxidant capacities of selected Chinese medicinal plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(6), 2362-2372. Doi:10.3390/ijms11062362.

**Song, M.K., Um, J.Y., Jang, H.J., & Lee, B.C. (2012).** Beneficial effect of dietary *Ephedra sinica* on obesity and glucose intolerance in high-fat diet-fed mice. *Experimental and therapeutic medicine*, 3(4), 707-712. Doi: 10.3892/etm.2012.462.

**Sroka, Z., & Cisowski, W. (2003).** Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food and Chemical Toxicology*, 41(6), 753-758. Doi: org/10.1016/S0278-6915(02)00329-0.

**Starratt, A.N., & Caveney, S. (1995).** Four cyclopropane amino acids from *Ephedra*, *Phytochemistry*, 40(2), 479-481. Doi: org/10.1016/0031-9422(95)00342-5.

**Surveswaran, S., Cai, Z.Y., Cark, H., & Sun, M. (2007).** Systematic evaluation of natural phenolic antioxidant from 133 indian medicinal plants. *Food chemistry*, 102(3), 938-953. Doi: org/10.1016/j.foodchem.2006.06.033

**Taha, S.O. (2013).** *In vivo* antimicrobial activity of ethanol extract of Sumac (*Rhus coriaria*) on *Klebsiella pneumoniae*. *British Journal of Pharmacology and Toxicology*. 4(1), 1-4. Doi: org/10.19026/bjpt.4.5380.

**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. Doi: org/10.1271/bbb.58.1780.

**Tang, J., Zhou, J., Tang, Q., Wu, T., & Cheng, Z. (2015).** A new TLC bioautographic assay for qualitative and quantitative estimation of lipase inhibitors. *Phytochemical analysis*, 27(1): 5-12. Doi: 10.1002/pca.2581.

**Tavares, L., Figueira, I., Macedo, D., Mc Dougall, G.J., Leitão, M.C., Vieira, H.L. A., & Santos, C.N. (2012).** Neuroprotective effect of blackberry (*Rubus sp*) polyphenols is potentiated after simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 131(4), 1443-1452. Doi: org/10.1016/j.foodchem.2011.10.025.

**Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Byrne, D.H. (2006).** Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7), 669-675. Doi: org/10.1016/j.jfca.2006.01.003.

**Thomas-Valdés, S., Theoduloz, C., Jiménez-Aspecc, F., Burgos-Edwards, A., & Schmeda-Hirschmann, G. (2018).** Changes in polyphenol composition and bioactivity of the native Chilean white strawberry (*Fragaria chiloensis* spp. *chiloensis* f. *chiloensis*) after *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Research International*, 105, 10-18. Doi: 10.1016/j.foodres.2017.10.074.

**Tian, F., Li, B., Ji, B., Zhang, G., & Luo, Y. (2009).** Identification and structure-activity relationship of gallotannins separated from *Galla chinensis*. *LWT- Food Science and Technology*, 42(7), 1289-1295.

**Tiberti, L.A., Yariwake, J.H., Ndjoko, K., & Hostettmann, K. (2007).** Identification of flavonols in leaves of *Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium* (Celastraceae) by LC/UV/MS

analysis. *Journal of Chromatography B*, 846(1-2), 378-384. Doi: 10.1016/j.jchromb.2006.09.014.

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

**Tiss, A., Miled, N., Verger, I., Gargouri, Y., & Abousalham, A. (2004).** Digestive lipases inhibition: an *in vitro* study. in *Lipases and Phospholipases in Drug Development: from Biochemistry to Molecular Pharmacology*, (Eds), Germany, p. 155-194. Doi: org/10.1002/3527601910.ch9

**Tomé-Carneiro, J., & Visioli, F. (2016).** Polyphenol-based nutraceuticals for the prevention and treatment of cardiovascular disease: Review of human evidence. *Phytomedicine*, 23(11), 1145-1174. Doi: 10.1016/j.phymed.2015.10.018.

**Torres De Pinedo, A., Pen Alver, P., & Morales, J.C. (2007).** Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidant: structure-activity relation ship. *Food Chemistry*, 103(1), 55-61. Doi: org/10.1016/j.foodchem.2006.07.026.

**Trayhurn, P., & Wood, I.S. (2004).** Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *The British journal of nutrition*, 92(3), 347-355. Doi: 10.1079/bjn20041213

**Tricker, A.R., Wacker, C.D., Reussmann, R.P. (1987).** 2-(N-nitroso-N-methylamino) propiophenone, a direct acting bacterial mutagen found in nitrosated *Ephedra altissima* tea. *Toxicology Letters*, 38(1-2), 45-50. Doi : org/10.1016/0378-4274(87)90109-3.

**Tsao, R. (2010).** Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*. 2(12), 1231-1246. Doi: 10.3390/nu2121231.

**Turkoglu, A., Duru, M.E., Mercan, N., Kivrak, I., & Gezer, K. (2007).** Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Food Chemistry*, 101(1), 267-273. Doi: 10.1016/j.foodchem.2006.01.025.

**Ulanowska, K., Majchrzyk, A., Moskot, M., Jakóbkiewicz-Banecka, J., & Węgrzyn, G. (2007).** Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of generation times in liquid bacterial cultures. *Biologia*, 62, 132-135. Doi: org/10.2478/s11756-007-0042-3.

**Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., & Telser, J. (2007).** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.

*The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(1), 44-84. Doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001.

**Vangalapati, B., Manjrekar, P.A., & Hedge, A. (2014).** Total phenolic content and free radical scavenging activity of *Pterocarpus marsupium* heartwood and *Tribulus terrestris* dry fruits, *Journal of pharmacy research*, 8(5), 610-613.

**Vazquez-Flores, A.A., Wong-Paz, J.E., Lerma-Herrera, M.A., Martinez- Gonzalez, A.I., Olivas-Aguirre, F.J., Aguilar, C.N., Alvarez-Parrillaa, A., & De la Rosaa, L.A. (2017).** Proanthocyanidins from the kernel and shell of pecan (*Carya illinoensis*): Average degree of polymerization and effects on carbohydrate, lipid, and peptide hydrolysis in a simulated human digestive system. *Journal of Functional Foods*, 28, 227-234. Doi: org/10.1016/j.jff.2016.11.003.

**Velickovic, D.T., Nikolova, M.T., Ivancheva, S.V., Stojanovic, J.B., & Veljkovic, V.B. (2007).** Extraction of flavonoids from garden (*Salvia officinalis* L.) and glutinous (*Salvia glutinosa* L.) sage by ultrasonic and classical maceration. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 72(1), 73-80.

**Verardo, V., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Marconi, E., Fernandez-Gutierrez, A., & Caboni, M.F. (2010).** Identification of buckwheat phenolic compounds by reversephase high-performance liquid chromatography electrospray ionization-time offlight-mass spectrometry (RP-HPLC-ESI-TOFMS). *Journal of Cereal Science*, 52(2), 170-176. Doi : org/10.1016/j.jcs.2010.04.009.

**Vinodhini, S., Shri, P.M., Nusrath, F.N., Shivani, S.K., & Devi, R.V. (2016).** Antioxidant and free radical scavenging activity of *punica granatum* leaf extracts. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(6), 140-146. Doi: 10.22159/ajpcr.2016.v9i6.13941.

**Vinodhini, V., Himaja, M., Sai, S., & Poppy, D. (2015).** *In vitro* antidiabetic activity of *Tragia involucrata* Linn. Leaf extracts. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 6(1), 1-3. Doi: 10.7897/2277-4343.0611.

**Vundać, B.V., Brantner, A.H., & Plazibat, M. (2007).** Content of polyphenolic constituents and antioxidant activity of some *Stachys* taxa. *Food Chemistry*, 104(3), 1277-1281. Doi:10.1016/J.FOODCHEM.2007.01.036.

**Wächter, G.A., Hoffmann, J.J., Furbacher, T., Blake, M.E., & Timmermann, B.N., (1999).** Antibacterial and antifungal flavanones from *Eysenhardtia texana*. *Phytochemistry* 52(8), 1469-1471. Doi: org/10.1016/S0031-9422(99)00221-6.

**Walter, C., Shinwari, Z. K., Afzal, I., & Malik, R. N. (2011).** Antibacterial activity in herbal products used in Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 43, 155-162.

**Wang, B., Liu, H.C., Hong, J.R., Li, H.G., & Huang, C.Y. (2007).** Effect of *Psidium guajava* leaf extract on alpha-glucosidase activity in small intestine of diabetic mouse. *Journal of Sichuan University. Medical science edition*, 38(2), 298-301.

**Wang, H., Gao, X.D., Zhou, G.C., Cai, L., & Yao, W.B. (2008).** *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of aqueous extract from *Choerospondias axillaris* fruit. *Food Chemistry*. 106(3), 888-895. Doi: org/10.1016/j.foodchem.2007.05.068.

**Wang, Y., Tang, C., & Zhang, H. (2015).** Hepatoprotective effects of kaempferol 3-O-rutinoside and kaempferol 3-O-glucoside from *Carthamus tinctorius* L. on CCl<sub>4</sub>-induced oxidative liver injury in mice. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(2), 310-317. Doi: 10.1016/j.jfda.2014.10.002.

**Weill, B., Batteux, F., & Dhainaut, J. (2003).** Immunopathologie et réactions inflammatoires, Eds, *De Boeck Université Paris*: 12-23 p.

**Williams, L.A.D., Connar, A.O., Latore, I., Dennis, O., Ringer, S., Whittaker, J.A., Conard, J., Vogler, B., Rosner, H., & Kraus W. (2008).** The *in vitro* anti-denaturation effects induced by natural products and non-steroidal compounds in heat treated (immunogenic) bovine serum albumin is proposed as a screening assay for the detection of anti-inflammatory compounds, without the use of animals, in the early stages of the drug discovery process. *The West Indian medical journal*, 57(4), 327-331.

**Winkel-Shirley, B. (2002).** Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(3), 218-223. Doi: org/10.1016/S1369-5266(02)00256-X.

**Wintola, O.A., & Afolayan, A.J. (2015).** The antibacterial, phytochemicals and antioxidants evaluation of the root extracts of *Hydnora Africana* Thunb. used as antidysenteric in Eastern Cape Province, South Africa. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15, 307-318. Doi: org/10.1186/s12906-015-0835-9.

**Wojakowska, A., Perkowski, J., Góral, T., Stobiecki, M. (2013).** Structural characterization of flavonoid glycosides from leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.) using

LC/MS/MS profiling of the target compounds. *Journal of mass spectrometry*, 48(3), 329-339. Doi: 10.1002/jms.3160.

**Won, S.R., Kim, S.K., Kim, Y.M., Lee, P.H., Ryu, J.H., Kim, J.W., & Rhee, H.I. (2007).** Licochalcone A: A lipase inhibitor from the roots of *Glycyrrhiza uralensis*. *Food Research International*, 40(8), 1046-1050. Doi: org/10.1016/j.foodres.2007.05.005.

**Wootton-Beard, P.C., Moran, A., & Ryan, L. (2011).** Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after *in vitro* digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. *Food Research International*, 44(1), 217-224. Doi: org/10.1016/j.foodres.2010.10.033.

**Xiu, L.M., Miura, A.B., Yamamoto, K., Kobayashi, T., Song, Q.H., Kitamura, H., & Cyong, J.C. (2001).** Pancreatic islet regeneration by ephedrine in mice with streptozotocin-induced diabetes. *The American journal of Chinese medicine*, 29(3-4), 493-500. Doi: org/10.1142/S0192415X01000514.

**You, Q., Chen, F., Wang, X., Jiang, Y., & Lin, S. (2012).** Anti-diabetic activities of phenolic compounds in muscadine against alpha-glucosidase and pancreatic lipase. *LWT - Food Science and Technology*, 46(1), 164-168. Doi: 10.1016/j.lwt.2011.10.011.

**Yukiko, T., Shikishima, Y., Takaishi, I., Shibata, H., & Higutu, T. (2002).** Coumarins and gamma pyrone derivatives from *Prangos pabularia*: Antibacterial activity and inhibition of cytokine release. *Phytochemistry*, 59(6), 649-654. Doi: 10.1016/s0031-9422(02)00023-7.

**Zduńska, K., Agnieszka, D., Kolodziejczak., A., & Rotsztejn, H. (2018).** Antioxidant properties of ferulic acid and its possible application. *Skin Pharmacology and Physiology*, 31(6), 332-336. Doi: 10.1159/000491755.

**Zelko, I.N., Mariani, T.J., & Folz, R.J. (2002).** Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(3), 337-349. Doi: 10.1016/s0891-5849(02)00905-x.

**Zhang, B.M., Wang, Z.B., Xin, P., Wang, Q.H., Bu, H., & Kuang, H.X. (2018).** Phytochemistry and pharmacology of genus *Ephedra*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 16(11), 811-828. Doi:10.1016/s1875-5364(18)30123-7.

## Références bibliographiques

**Zhang, H., Kong, B., Xiong, Y.L., & Sun, X. (2009).** Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4°C. *Meat Science*, 81(4), 686-692. Doi: 10.1016/j.meatsci.2008.11.011.

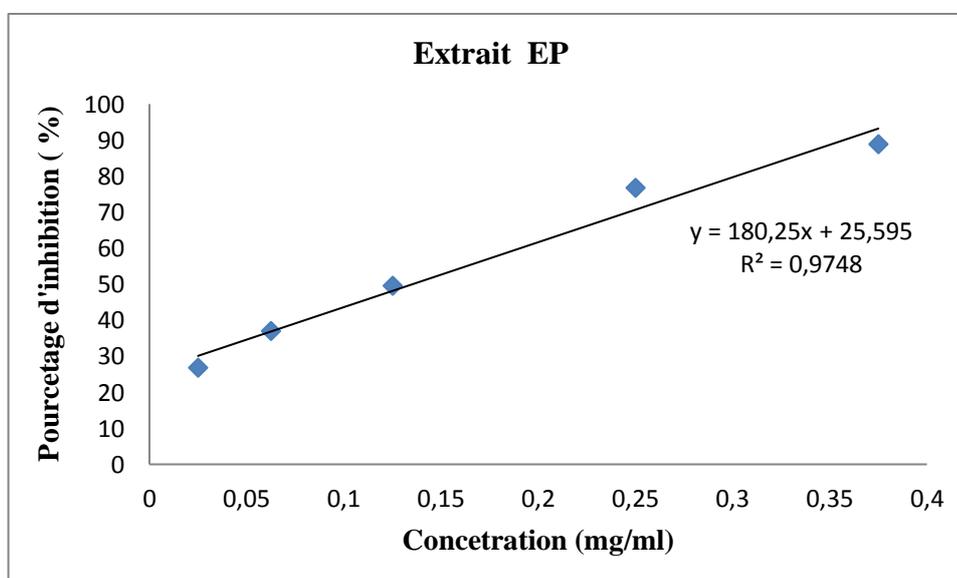
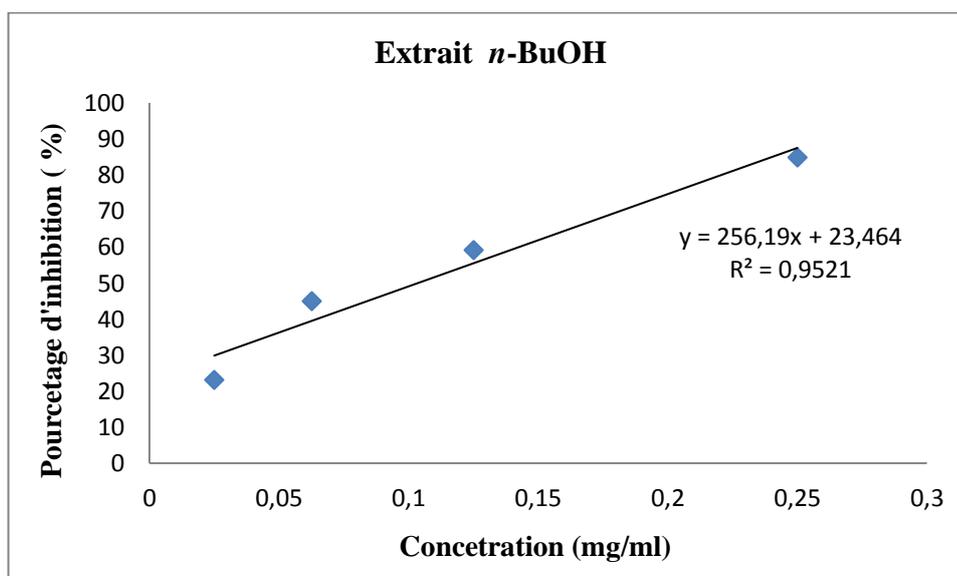
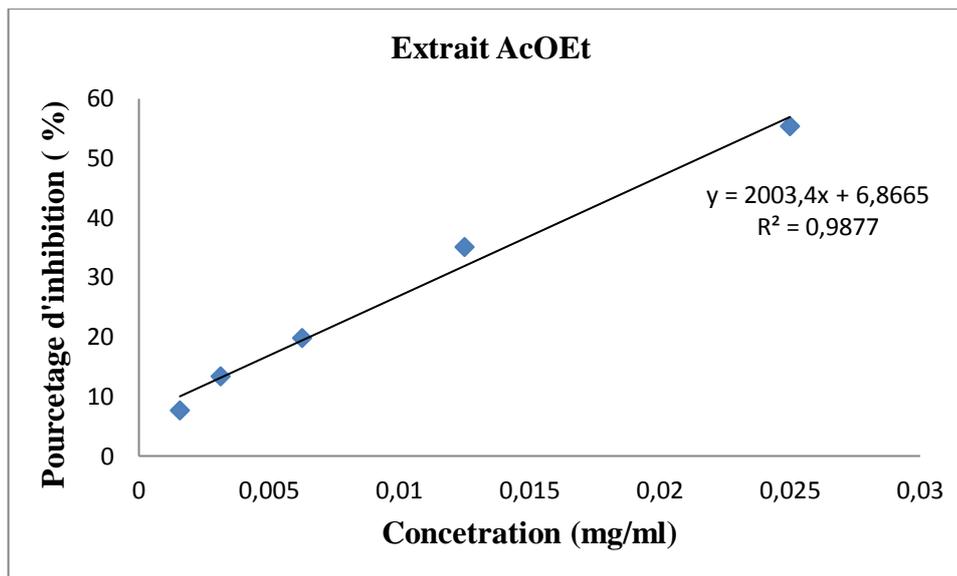
**Zhang, W., Xu, M., Yu, C., Zhang, G., & Tang, X. (2010).** Simultaneous determination of vitexin-4"-*O*-glucoside, vitexin-2"-*O*-rhamnoside, rutin and vitexin from hawthorn leaves flavonoids in rat plasma by UPLC–ESI-MS/MS. *Journal of Chromatography B*, 878(21), 1837-1844.

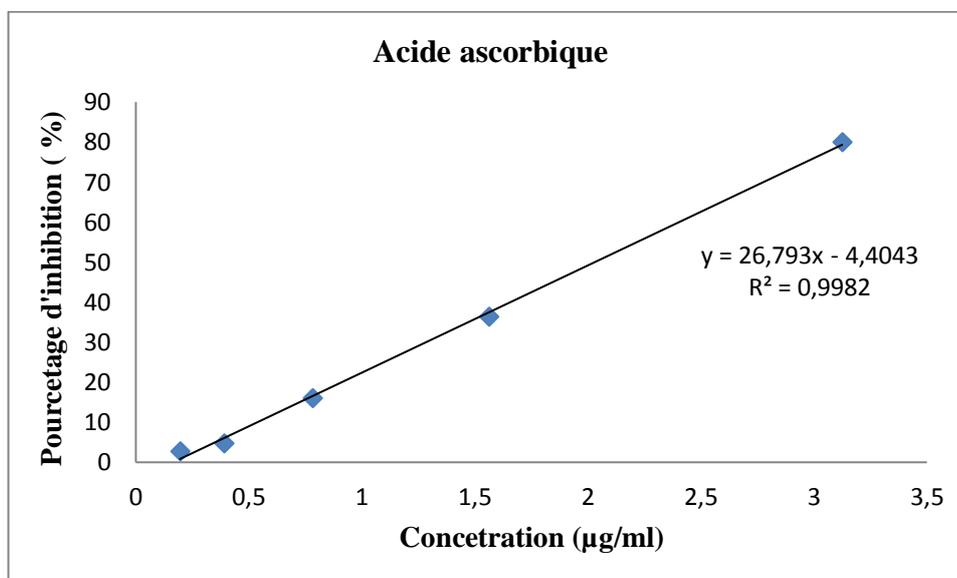
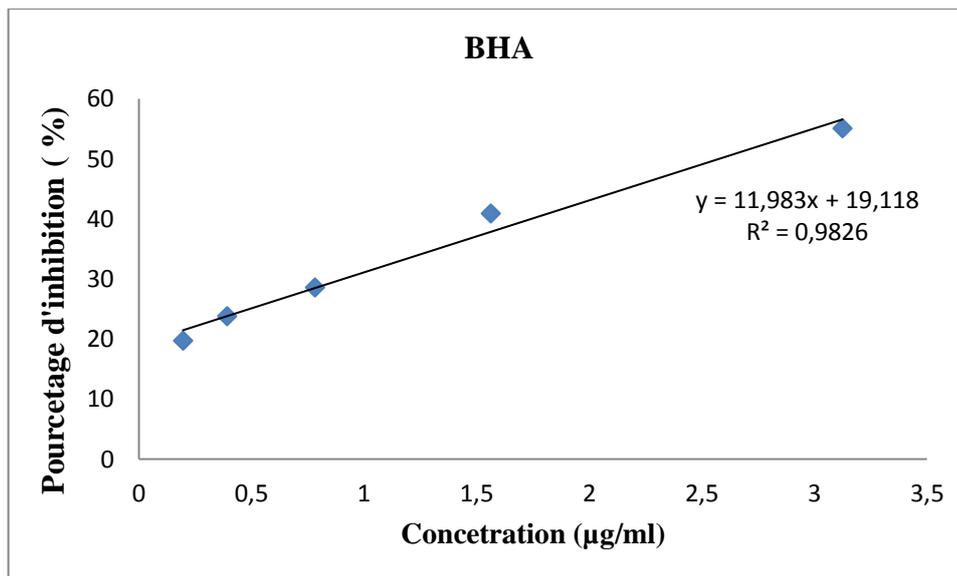
**Zhao, H., Zhang, H., & Yang, S. (2014).** Phenolic compounds and its antioxidant activities in ethanolic extracts from seven cultivars of Chinese jujube. *Food Science and Human Wellness*, 3(4), 183-190. Doi:10.1016/j.fshw.2014.12.005.

**Ziani, B.E.C., Heleno, S.A., Bachari, K., Dias, M.I., Alves, M.J., Barros, L., & Ferreira, I.C. (2019).** Phenolic compounds characterization by LC-DAD- ESI/MSn and bioactive properties of *Thymus algeriensis* Boiss & Reut and *Ephedra alata* Decne. *Food Research International*, 116, 312-319. Doi: org/10.1016/j.foodres.2018.08.041.

# **Annexes**

---





**Annex 01** : Courbe représentant le pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration des standards et des différents extraits de *l'E. altissima* (chaque valeur représente la moyenne de trois essais  $\pm$  SD).

## Annexes

	<i>polyphénols</i>	<i>Flavonoïdes</i>	<i>Tanins</i>	<i>DPPH</i>	<i>FTC</i>	<i>CAT</i>	<i>FRAP</i>	<i>β carotene</i>	<i>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i>	<i>ABTS</i>	<i>Reducing power</i>	<i>Reduction de permanganate</i>	<i>Anti-lipase</i>
<b>polyphénols</b>	1												
<b>Flavonoïdes</b>	0,77366735	1											
<b>Tanins</b>	0,27711242	0,82317179	1										
<b>DPPH</b>	-0,9871373	-0,6624205	-0,11993	1									
<b>FTC</b>	0,9902804	0,85427097	0,40805	-0,95530	1								
<b>CAT</b>	0,98981099	0,67556887	0,137477	-0,99982	0,96038	1							
<b>FRAP</b>	0,99647036	0,7177495	0,195476	-0,99707	0,9751	0,99827	1						
<b>β carotene</b>	0,94301214	0,5187447	-0,05840	-0,98408	0,88756	0,98078	0,96761	1					
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	-0,11476409	0,54061649	0,922686	0,27210	0,02451	-0,25504	-0,1977	-0,43878	1				
<b>ABTS</b>	0,96493622	0,5802316	0,01519	-0,99448	0,91904	0,99247	0,98356	0,99729	-0,37149	1			
<b>Reducing power</b>	0,94700633	0,52914868	-0,046208	-0,98617	0,89312	0,98309	0,97062	0,99992	-0,42777	0,99811	1		
<b>Reduction de permanganate</b>	-0,99453	-0,703306	-0,1753054	0,998432	-0,97035	-0,999266	-0,99978	-0,972594	0,2178285	-0,987063	-0,975361	1	
<b>Anti-lipase</b>	-0,94971483	-0,93315127	-0,564031	0,88743	-0,98403	-0,89545	-0,92007	-0,79140	-0,20205	-0,83422	-0,79880	0,911843	1
<b>Anti-α-amylase</b>	-0,94193565	-0,9415009	-0,583665	0,87613	-0,97948	-0,88452	-0,91042	-0,77651	-0,22547	-0,82076	-0,78415	0,05152	0,99971
<b>Anti-arthritique</b>	-0,97719477	-0,62148361	-0,066763	0,99857	-0,93816	-0,99747	-0,99157	-0,99216	0,32308	-0,99866	-0,99361	0,05152	0,86156

**Annex 02:** correlation entre toutes les activités biologiques réalisées (test Pearsen)

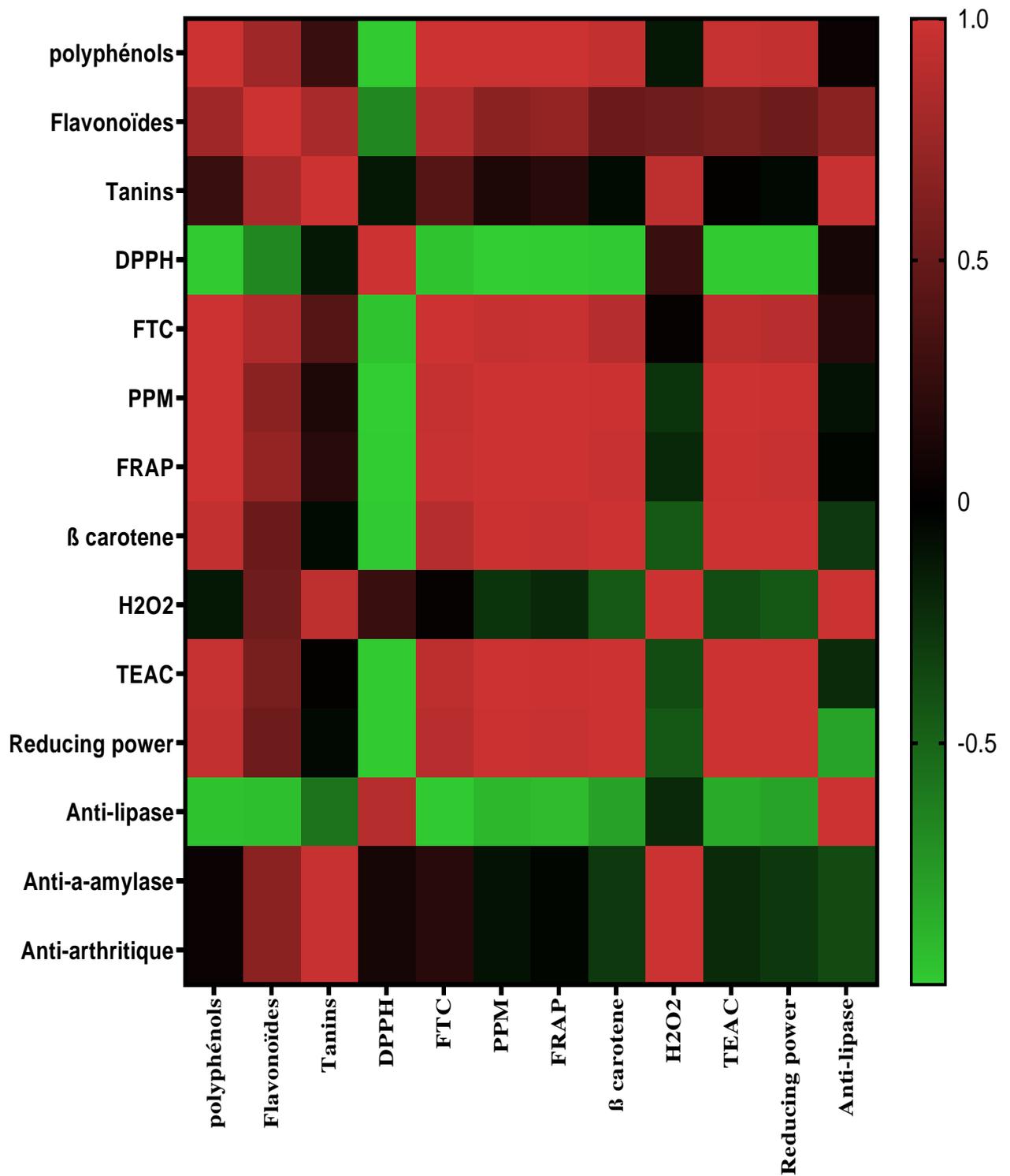
## Annexes

	<b>polyphénols</b>	<b>Flavonoïdes</b>	<b>Tanins</b>	<i>E. coli</i> <b>(CIP 7624)</b>	<i>E. coli</i> <b>(DSM 1103)</b>	<i>E. coli</i> <b>(ATTC 25922)</b>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. pneumoniae</i>
<b>polyphénols</b>	1								
<b>Flavonoïdes</b>	0,77366735	1							
<b>Tanins</b>	0,27711242	0,82317179	1						
<i>E. coli</i> <b>(CIP 7624)</b>	0,79969528	0,99911062	0,79849817	1					
<i>E. coli</i> <b>(DSM 1103)</b>	0,75251995	0,99946446	0,84131085	0,99719576	1				
<i>E. coli</i> <b>(ATTC 25922)</b>	0,60935607	0,97381191	0,93070502	0,96335917	0,98073015	1			
<i>P. aeruginosa</i>	0,54983701	0,95461258	0,9549273	0,94120443	0,96384792	0,99733091	1		
<i>S. aureus</i>	0,09797849	-0,55474074	-0,92906341	-0,51916431	-0,58167	-0,72937792	-0,77738089	1	
<i>S. pneumoniae</i>	0,03106502	-0,60925222	-0,95176527	-0,57527375	-0,63487455	-0,77358437	-0,81778814	0,99775192	1
<i>S. mutans</i>	0,89470622	0,40920789	-0,18122877	0,4473179	0,37913087	0,1910433	0,1188641	0,532168	0,4742336

**Annex 03:** Correlation entre les polyphénols, flavonoides et tanins et activités anti-bacterienne (test de Pearsen)

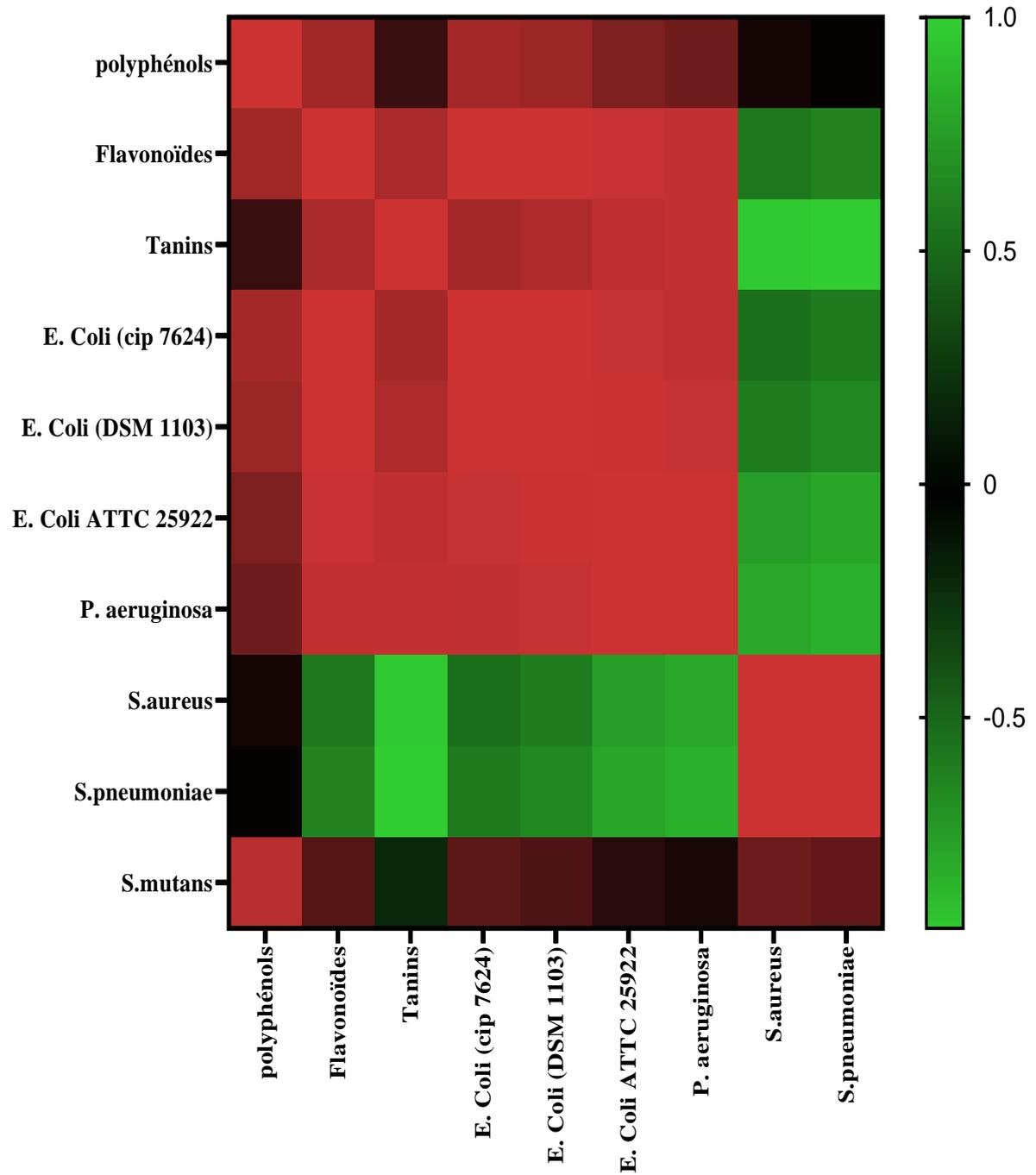


# Annexes



**Annexe 04** : Heatmap de corrélation entre toutes les activités biologiques réalisées (test Pearsen)

## Annexes



**Annexe 05** : Heatmap de corrélation entre les polyphénols, flavonoides et tanins et activités anti-bacterienne (test de Pearsen)

# **Communications et publications**

---

## Communications et publications

### 1. Communications internationales

In-vitro anti-diabetic and antioxidant activities of the medicinal plant *Ephedra altissima*. Vème Colloque International de Chimie (CIC-5), 4-6 Décembre **2018**. Université de Batna-1, Algérie.

In-vitro anti-arthritic and enzyme inhibition activities of crude extracts derived from the medicinal plant *Ephedra altissima*. The third international symposium medicinal plants and materials (MPM). February 25-27, **2020**. University of Tebessa, Algeria.

Anti-inflammatory, antidiabetic and antioxydant activities of the butanolic extract from the stem of *Ephedra altissima*. International euroasia congress on scientific reserches and recent trend-VII. 6-9 December **2020**. Baku, Azerbaijan.

Study of total phenol, flavonoids contents and anti-bacterial activity of the n-butanol extract of *Ephedra altissima* Desf. In Colon Cancer Cell Lines. Asia pacific international modern sciences congress. 12-13 December **2020**. College of subic Montessori-subic bay, Philippines.

### 2. Communication nationales

Antibacterial activity of crude extract obtained from the species *Ephedra altissima*. Séminaire national de biodiversité, biologie médicale et ecotoxicology environnementale, 30-31 octobre **2019**. Université de Skikda, Algérie.

Anti-obesity and anti-inflammatory effects of bioactive compounds isolated from *Ephedra altissima* plants. 1<sup>ères</sup> journées d'étude sur la chimie et ces applications (JECA-1). 27 Novembre **2019**. Université de Batna 1, Algérie.

In vitro antioxidant activities of extracts of *Ephedra altissima* stems. Premier colloque national de biotoxicologie et bioactivité. 27 novembre **2019**. Université Oran 1, Algérie.

Preliminary phytochemical screening, quantitative estimation of total flavonoids, total phenols and anti-bacterial activity of *Ephedra altissima* Defs. 1<sup>er</sup> séminaire national sur l'apport des biotechnologies sur la protection de l'environnement. 15-16 Décembre, **2019**. Université de M'Sila, Algérie.

### 3. Autres contribution

#### Communication

Impact de l'obésité sur la fertilité chez une population des femmes de la wilaya de Batna. 1<sup>er</sup> séminaire national sur la biotechnologie des molécules bioactives et pathologie cellulaire (1<sup>er</sup> SNBMBPC), 26-27 Octobre **2013**. Université de Batna, Algérie.

Preparation impact of obesity on fertility in a population of women in the wilaya of Batna. International conference on agriculture, biotechnology, biological and biosystems engineering (ICABBBE), February 27-28, **2014**. Barcelona, Spain.

Evaluation of the prevalence and some biological parameters of viral hepatitis in Tebessa region. La première journée scientifique sur la biologie des plantes médicinales, 22 janvier **2020**. Université de Tebessa, Algérie

Phytochemical screening and antioxidant properties of the plant *Ephedra altissima*. Premier colloque international sur la lutte biologique et intégrée en Algérie, 4-6 février **2019**. Université de Batna 2, Algérie.

Epigenetic Modifier, 5-Aza-2'-Deoxycytidine, Differentially Change Viability, In Colon Cancer Cell Lines. Asia pacific international modern sciences congress. 12-13 December **2020**. College of subic Montessori-subic bay, Philippines.

#### Articles

Chennaf, A., Yahia, M., **Bouafia, W.**, Benbia, S., Khellaf, D. (2014). Impact of Obesity on Fertility in a population of women in the wilaya of Batna. *International Journal of Agricultural and Biosystems Engineering*, 8(2); 105-108. Doi: org/10.5281/zenodo.1090998.

Ghecham, A., Senator, A., Pawlowska, E., **Bouafia, W.**, Błasiak, J. Epigenetic modifiers 5-aza-2'-deoxycytidine and valproic acid differentially change viability, DNA damage and gene expression in metastatic and non-metastatic colon cancer cell lines, *Acta biochimica Polonica*, 66(3);355-360. Doi: 10.18388/abp.2019\_2814.

## ملخص

*Ephedra altissima* Desf. هي نبتة طبية من عائلة الإيفيدراسيا، تستخدم على نطاق واسع في الطب التقليدي لعلاج أمراض الجهاز التنفسي. يهدف هذا البحث الى دراسة التركيب الكيميائي و تقييم الانشطة البيولوجية لكافة المستخلصات العضوية (اثير البترول، استات الاثيل و البوتانول) التي تم الحصول عليها انطلاقا من نبات *Ephedra altissima*.

لقد اجريت الاختبارات اللونية للكشف عن وجود العديد من مركبات الايض الثانوية. تم تحديد كميات البوليفينول الكلي والفلافونويد الكلي و الدوايح المكثفة عن طريق المقياسات الطيفية. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات الخامة بثمانية طرق مختلفة بينما تم تنفيذ النشاط المضاد لالتهاب المفاصل بواسطة طريقة فقدان بنية مصل البومين الثور. تم تقييم النشاط المثبط لانزيمي الالفا أميلاز والليباز البنكرياسي بالطرق اللونية باستخدام النشاء و p-nitrophenyl butyrate كركائز، تمت محاكاة الظروف الفسيولوجية للهضم البشري من خلال نماذج الهضم المعدي المعوي (DGI) في المختبر. تم تقييم النشاط المضاد للبكتيريا باستخدام طريقة الانتشار القرصي ضد سبعة سلالات بكتيرية. تم إجراء تحليل وقياس كمية المركبات الفينولية بواسطة LC-DAD-ESI/MS. تم إجراء الفحص الكيميائي لمستخلص البوتانول من خلال استخدام مختلف الطرق الكروماتوغرافية (VLC، CC، CCE و TLC). تم تحديد البنية الهيكلية للمركبين A و B من خلال استخدام طرق التحليل الطيفي كمتيافية الرنين النووي المغناطيسي بجميع انواعها، مطيافية الكتلة ومن خلال المقارنة مع الدراسات السابقة.

من خلال هذا العمل نستنتج ثراء المستخلصات بمركبات الايض الثانوية، يحتوي مستخلص خلات الاثيل على أعلى محتوى من مركبات البوليفينول (125,62 ميكروغرام/مغ)، ويحتوي مستخلص البوتانول على أعلى محتوى من مركبات الفلافونويد (19.18 ميكروغرام/مغ). جميع المستخلصات لديها أنشطة مضادة للأكسدة في مختلف المعايير التي اجريت. سجل مستخلص خلات الاثيل أقوى نشاط مضاد لالتهاب المفاصل و نشاط التثبيط لانزيمي الالفا أميلاز والليباز البنكرياسي بقيم  $IC_{50}$  تقدر ب (  $126,4 \pm 2,36$ ،  $8,07 \pm 0,15$  و  $289,1 \pm 0,53$  ميكروغرام/مل) على التوالي. اظهرت النتائج بالنسبة للنشاط المضاد للبكتيريا ان جميع المستخلصات التي تم اختبارها لها فعالية على الاقل ضد ثلاث سلالات مع MICs تتراوح من (3,12 إلى 50 ميكروغرام/مل). التحليل بواسطة LC-DAD-ESI/MS سمح بتحديد وجود 19 مركب طبيعي، بما في ذلك 8 مركبات عبارة عن احماض فينول بسيطة ومشتقات احماض الفينول و 11 مركب عبارة عن فلافونويدات مرتبطة بمجاميع سكرية. ادت الدراسة الفيتوكيميائية لمستخلص البوتانول الى عزل و تحديد البنية الهيكلية لاثنتان من الفلافونويدات: Isorhamnétine 3-O-  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1''''-6''')- $\beta$ -D-galactopyranoside, Kaempférol 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1''''-6''')- $\beta$ -D-glucopyranoside

**الكلمات المفتاحية:** *Ephedra altissima* Desf.، أنشطة بيولوجية، فلافونويدات، LC-DAD-ESI/MS، RMN.

## Abstract

*Ephedra altissima* Desf. is a medicinal plant from the Ephedraceae family, widely used in traditional medicine for the treatment of respiratory diseases and diabete. The objective of the present study was the evaluation *in vitro* of the biological activities and the phytochemical characterization of *Ephedra altissima* extracts (petroleum ether, ethyl acetate and *n*-butanol).

Colorimetric assays were performed to reveal the presence of different classes of secondary metabolites. The determination of the polyphenols, flavonoids and condensed tannins contents was carried out by spectrophotometric assays. The antioxidant activity was evaluated by eight different methods, the anti-arteritic activity was performed by bovine serum albumin denaturation method and the inhibitory activities of  $\alpha$ -amylase and pancreatic lipase *in vitro* were evaluated by colorimetric methods using starch and p-nitrophenyl butyrate as substrates. The physiological conditions of human digestion were simulated by the model of gastrointestinal digestion (DGI) *in vitro*. The antibacterial activity was estimated by agar disk diffusion assay against seven bacterial strains. Analysis and quantification of phenolic compounds were performed by LC-DAD-ESI/MS. The phytochemical investigation of the *n*-butanol extract was carried out by the alternating use of various chromatographic methods (VLC, CC, PTLC and TLC). The structures of the two compounds A and B were identified by spectroscopic analysis ESI-MS, UV and NMR in its multiple techniques,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, and 2D NMR (COSY, HSQC, HMBC and TOCSY).

The results indicated the richness of this plant in secondary metabolites, the EtOAc extract recorded the highest content of polyphenols (125, 62  $\mu\text{g}$  EGA  $\text{mg}^{-1}$ ), and the *n*-BuOH extract had the highest content of flavonoids (19,18  $\mu\text{g}$  EQ  $\text{mg}^{-1}$ ). All the extracts exhibited antioxidant activities in various assays and the aqueous extract has shown good antioxidant activity by potentiometric method. The EtOAc extract has the strongest anti-arteritic activity,  $\alpha$ -amylase and pancreatic lipase inhibitory activities with  $\text{IC}_{50}$  values ( $126.4 \pm 2.36$ ,  $8.07 \pm 0.15$  and  $289.1 \pm 0.53$   $\mu\text{g} / \text{ml}$ ), respectively. All the crude extracts showed antibacterial activity in dose-dependent manner against at least three strains with MICs ranging from (3.12 to 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Analysis by LC-DAD-ESI/MS has detected the presence of nineteen different compounds, eight were simple phenolic acids and phenolic acid derivatives, and eleven were flavonoids linked to glycosyl groups. The phytochemical investigation carried out on the *n*-batanolic extract led to the isolation and structural identification of two glycosylated flavonoids named: Isorhamnetin 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1''''-6'')-  $\beta$ -D-galactopyranoside et Kaempferol 3-*O*-  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1''''-6'')-  $\beta$ -D-glucopyranoside.

**Keywords:** *Ephedra altissima* Desf., *in vitro* biological activities, flavonoids, LC-DAD-ESI/MS, NMR.

## Résumé

*Ephedra altissima* Desf. est une plante médicinale de la famille des Ephedraceae, largement utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement des maladies respiratoires et le diabète. L'objectif de la présente étude est l'évaluation des activités biologiques *in vitro* et la caractérisation phytochimique des extraits (éther de pétrole, acétate d'éthyle et *n*-butanol) obtenus à partir de la plante *Ephedra altissima*.

Des dosages colorimétriques ont été effectués pour révéler la présence de différentes classes de métabolites secondaires. La détermination des teneurs en polyphénols, flavonoïdes et tanins condensés a été réalisée par des dosages spectrophotométriques. L'activité antioxydante a été évaluée par huit méthodes différentes, l'activité anti-artéritiques a été réalisée par la méthode d'inhibition de la dénaturation du sérum d'albumine bovin, les activités inhibitrices de l' $\alpha$ -amylase et de la lipase pancréatique *in vitro* ont été estimées par des méthodes colorimétriques en utilisant de l'amidon et du *p*-nitrophényl butyrate en tant que substrats. Les conditions physiologiques de la digestion humaine ont été simulées par le modèle de la digestion gastro-intestinale (DGI) *in vitro*. L'activité antibactérienne a été déterminée par la méthode de diffusion sur disques en milieu gélosé contre sept souches bactériennes. L'analyse et la quantification des composés phénoliques ont été effectuées par LC-DAD-ESI/MS. L'investigation phytochimique de l'extrait *n*-butanolique a été réalisée par l'utilisation en alternance de diverses méthodes chromatographiques (VLC, CC, CCE et CCM). Les structures des deux composés isolés A et B ont été identifiées par analyse spectroscopique ESI-MS, l'UV et la RMN dans ses multiples techniques, RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , et RMN 2D (COSY, HSQC, HMBC et TOCSY).

A l'issue de ces travaux, nous retiendrons la richesse de cette plante en métabolites secondaires. En effet, l'extrait AcOEt présente la teneur la plus élevée en polyphénols ( $125,62 \mu\text{g EAG mg}^{-1}$ ), et le *n*-BuOH possède la teneur la plus élevée en flavonoïdes ( $19,18 \mu\text{g EQ mg}^{-1}$ ). Tous les extraits ont des activités antioxydantes dans divers systèmes et l'extrait aqueux a montré une bonne activité antioxydante par la méthode potentiométrique. L'extrait AcOEt exhibe la plus forte activité anti-artéritique, activités inhibitrices de l' $\alpha$ -amylase et de la lipase pancréatique avec des valeurs de  $\text{CI}_{50}$  ( $126,4 \pm 2,36$ ,  $8,07 \pm 0,15$  et  $289,1 \pm 0,53 \mu\text{g/ml}$ ) respectivement. Tous les extraits testés exercent une activité antibactérienne dose dépendante contre au moins trois souches avec des CMI allant de ( $3,12$  à  $50 \mu\text{g/ml}$ ). L'analyse par LC-DAD-ESI/MS a permis de détecter la présence de dix-neuf composés différents, huit sont des acides phénoliques simples et des dérivés d'acide phénolique, et onze sont des flavonoïdes liés à des groupes glycosyles. L'investigation phytochimique réalisée sur l'extrait *n*-butanolique conduit à l'isolement et identification structurale de deux flavonoïdes glycosylés nommés : Isorhamnétine 3-*O*-  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1''''-6''')-  $\beta$ -D-galactopyranoside et Kaempférol 3-*O*-  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1''''-6''')-  $\beta$ -D-glucopyranoside.

**Mots-clés :** *Ephedra altissima* Desf., activités biologiques *in vitro*, flavonoïdes, LC-DAD-ESI/MS, RMN.