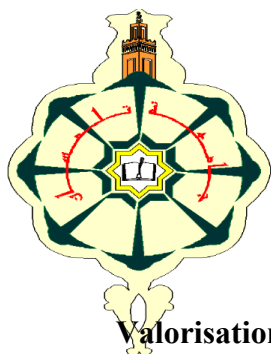


REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR & DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOU- BEKR BELKAID –TLEMCCEN



FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
ET SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Laboratoire :

Valorisation des Ressources Végétales et Sécurité Alimentaires des Zones Semi-arides du
Sud-ouest Algérien (VRVSA)

Thèse

En vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat en Science

Option : Microbiologie et sécurité sanitaire des aliments

Présentée par Mme :Hibi Zineb

Thème :

Etude des activités biologiques de deux plantes
de la région de Béchar *Ephedra alata* et *Atriplex*
halimus

Soutenu le : 10/10/2023

devant le jury

Rahmoun Mohamed Nadjib	Professeur	Université de Tlemcen	Président
Makhloufi Ahmed	Professeur	Université de Béchar	Directeur de thèse
Azzi Rachid	Professeur	Université de Tlemcen	Co-directeur de thèse
Mebarki lakhdar	M.C.A	Université de Béchar	Examineur
Benlarbi larbi	M.C.A	Université de Béchar	Examineur
Chaouche Mohammed Tarik	M.C.A	Université de Tlemcen	Examineur

Année Universitaire : 2022-2023

Je dédie ce travail...

A mes parents,

Pour leurs encouragements, leur tendresse, leur amour et leur soutien
durant mes études

A mon mari,

Pour sa patience exclusive et ses encouragements.

A mes filles,

Hibat Allah et Minat Allah

A mon fils,

Mohamed Kossay

A mes beaux-parents.

A mes sœurs, mes frères, mes belles sœurs et mon beau-frère.

A mes neveux et nièces.

A Ismahane

A mes amies.

Remerciements

Je remercie tout d'abord Allah qui m'a donné la santé et le courage pour terminer cette thèse.

Je remercie sincèrement Monsieur le Professeur **Makhloufi Ahmed**, mon directeur de thèse, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance tant pour m'avoir accordé sa confiance que pour m'avoir guidé dans mon travail, Ses conseils et ses commentaires, qu'il soit assuré de ma profonde gratitude.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements, mon profond respect, mon estime et gratitudes à Monsieur le Professeur **AZZI Rachid**, pour sa générosité, sa disponibilité et ses précieux conseils et orientations.

Je remercie chaleureusement Monsieur le Professeur **Rahmoun Mohamed Nadjib** de l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury de cette thèse. Trouvez ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Je désire remercier monsieur **Mebarki lakhdar**, MCA, Université de Béchar, Monsieur **Benlarbi larbi**, MCA, Université de Béchar, ainsi que Monsieur le Professeur **Chaouche Mohammed Tarik** qui m'ont accordé de leurs temps et ont accepté de participer à cette commission d'examen. Trouvez ici l'expression de mes sincères remerciements pour l'intérêt qu'ils ont voulu porter à ce travail.

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe Laboratoire de développement des ressources végétales et la sécurité alimentaire en régions semi-arides du Sud-Ouest de l'Algérie de l'Université de Béchar et les membres de l'équipe Laboratoire Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique de Tlemcen, pour leur aide et leur bonne humeur.

Je souhaite remercier spécialement Abou Faiza pour son aide et son soutien tout au long du travail au laboratoire Antibiotiques Antifongiques: Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique.

تعد المقاومة المتزايدة للكائنات الدقيقة للمضادات الحيوية مشكلة عالمية خطيرة. يهدف هذا البحث الى تحديد الجزيئات الحيوية الجديدة المستخلصة من النباتات الطبية ذات النشاط الواسع المضاد للبكتيريا. تم إجراء الأبحاث على نباتي *Ephedra alata* (العندة) و *Atriplex halimus* (القطف) نظراً لاستخداماتهما المتعددة. قمنا بدراسة اثنوباتية متعلقة باستخدام هاتين النباتين لأهداف طبية ودراسة تأثيراتهما المضادة للميكروبات ومضادات الأكسدة والمضادة لمرض السكر. تم إجراء الدراسة الاثنوباتية باستخدام استبيان وذلك للحصول عن لمحة للاستخدامات التقليدية لهاتين النباتين. تم تقييم مستخلصات ومشتقات العندة و القطف مخبريا ضد بعض السلالات البكتيرية والفطرية بطريقة تخفيف التركيز في الوسط السائل، وطريقة الانتشار على القرص في وسط جيلوزي و تحديد تركيزات الحد الأدنى المثبطة لمعرفة التأثيرات المضادة للميكروبات لمستخلصات ومشتقات العندة و القطف. بالإضافة الى ذلك، قمنا بتقييم أنشطتهما المثبطة لأنزيمي الالفا أميلاز والألفا غلوكوزيداز. أظهر الفحص الكيميائي النباتي النوعي أن العندة والقطف غنيتين بالفلافونويد، والصابونين والعفص. أظهر تقييم النشاط المضاد للميكروبات أن المستخلص المائي للعندة له أفضل نشاط مضاد للبكتيريا بقطر تثبيط قدره 20 مم ضد *Bacillus subtilis* بينما مستخلصات ومشتقات القطف كان تأثيرهم ضعيف. يملك المستخلص المائي للعندة نشاطا مثبطا كبيرا ضد الفطريات التي تم اختبارها، مع نسبة تثبيط 64.44% ضد *Aspergillus ochraceus*. بالنسبة للنشاط المضاد للأكسدة، كشفت طريقة إرجاع الحديد، وطريقة تثبيط الجذر الحر عن وجود نشاط مضاد للأكسدة للنبتين. كما أظهرت المشتقات والمستخلصات تأثيرا مثبطا كبيرا على الالفا أميلاز والألفا غلوكوزيداز. أظهر المستخلص الميثانولي للعندة والمستخلص المائي للقطف أحسن نتيجة لتثبيط الالفا أميلاز (CI50=39.47 ميكروغرام/ مل و CI50=50.36 ميكروغرام / مل على التوالي) بينما المستخلصين المائيين للعندة والقطف كان لهما أكبر نشاط مثبط للألفا غلوكوزيداز.

الكلمات المفتاحية: *Ephedra alata* ، *Atriplex halimus*، المستخلصات والمشتقات ، نشاط مضاد للأكسدة ، نشاط مضاد للميكروبات ، دراسة اثنوباتية، نشاط مضاد لمرض السكر ، بشار

Abstract

The increasing resistance of microorganisms to antibiotics is a serious global problem that has directed research towards the identification of new biomolecules with broad antibacterial activity extracted from medicinal plants *Ephedra alata* (Alinda) and *Atriplex halimus* (Guettaf) have been the subject of several researches because of its multiple uses. The purpose of this study was to evaluate ethnobotanical information on the use of *E. alata* and *A. halimus* for medicinal purposes, and to investigate the antimicrobial, antioxidant, and antidiabetic effects of these two plants. The ethnobotanical study of the plants was carried out using a questionnaire in order to obtain an overview of the various traditional uses. The extracts and fractions of *E. alata* and *A. halimus* were evaluated in vitro against selected bacterial and fungal strains. Broth dilution, disc diffusion and minimum inhibitory concentration (MIC) methods were used to determine the antimicrobial activity of the different extracts and fractions of the two plants. In addition, we evaluated their inhibitory activities on α -amylase and α -glucosidase in vitro. Phytochemical screening showed that *E. alata* and *A. halimus* are rich in flavonoids, saponins and tannins. The evaluation of the antimicrobial activity showed that the aqueous extract under reflux has the best antibacterial activity with an inhibition diameter of 20 mm against *Bacillus subtilis* for *E. alata* while for the extracts and fractions of *A. halimus* the effect was very moderate. The aqueous extract of *E. alata* has a significant activity against the fungal strains tested; with a percentage of inhibition of 64.44% on *Aspergillus ochraceus*. For antioxidant capacities, the ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activities of the extracts revealed the presence of antioxidant activities for both plants.

Thus, the extracts and fractions showed significant inhibitory effect on α -amylase and α -glucosidase. The methanolic extract of *E. alata* and aqueous extract of *A. halimus* showed the best α -amylase inhibition results (IC₅₀ = 39.47 μ g/ml and 50.36 μ g/ml, respectively) while the aqueous extracts of *E. alata* and *A. halimus* revealed the best α -glucosidase inhibitory power. **Keywords:** *Ephedra alata*, *Atriplex halimus*, Extracts and fractions, Antioxidant activity, Antimicrobial activity, Ethnobotanical study, Antidiabetic activity, Bechar.

Résumé

La résistance croissante des micro-organismes aux antibiotiques est un grave problème mondial, et la recherche a été orientée vers des nouvelles biomolécules à large activité antimicrobienne issus des plantes médicinales. *Ephedra alata* (Alinda) et *Atriplex halimus* (Guettaf) ont fait l'objet de plusieurs recherches en raison de ses multiples usages. Cette étude avait pour but d'évaluer les informations ethnobotaniques relatives à l'utilisation d'*E. alata* et *A. halimus* à des fins médicinales, et d'étudier les effets antimicrobiens, antioxydants et antidiabétiques de ces deux plantes. L'étude ethnobotanique des plantes est réalisée à l'aide d'un questionnaire afin d'obtenir un aperçu des diverses utilisations traditionnelles. Les extraits et les fractions d'*E. alata* et *A. halimus* ont été évalués *in vitro* contre certaines souches bactériennes et fongiques. Les méthodes de dilution en bouillon, de diffusion en disque et de détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) ont été utilisées pour déterminer l'activité antimicrobienne des différents extraits et fractions de deux plantes. De plus, nous avons évalué leurs activités inhibitrices *in vitro* sur l' α -amylase et l' α -glucosidase. Le screening phytochimique a montré que *E. alata* et *A. halimus* sont riches en flavonoïdes, saponines et tannins. L'évaluation de l'activité antimicrobienne a montré que l'extrait aqueux sous reflux a la meilleure activité antibactérienne avec un diamètre d'inhibition de 20 mm contre *Bacillus subtilis* pour *E. alata* tandis que pour les extraits et fractions d'*A. halimus* l'effet a été très modéré. L'extrait aqueux d'*E. alata* a une activité significative contre les souches fongiques testées ; avec un pourcentage d'inhibition de 64,44% sur *Aspergillus ochraceus*. Pour les capacités antioxydantes, le pouvoir antioxydant réducteur de l'ion ferrique (FRAP) et les activités de piégeage des radicaux libres 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) des extraits ont montré des activités antioxydantes pour les deux plantes. Ainsi, les extraits et les fractions ont montré un effet inhibiteur significatif sur l' α -amylase et l' α -glucosidase. L'extrait méthanolique d'*E. alata* et aqueux d'*A. halimus* ont montré les meilleurs résultats d'inhibition α -amylase (CI50 = 39,47 μ g/ml et 50,36 μ g/ml, respectivement) alors que les extraits aqueux d'*E. alata* et d'*A. halimus* ont révélé le meilleur pouvoir inhibiteur de l' α -glucosidase.

Mots clés : *Ephedra alata*, *Atriplex halimus*, Extraits et fractions, Activité antioxydante, Activité antimicrobienne, Etude ethnobotanique, Activité antidiabétique, Béchar.

Liste des abréviations

ATCC	l'American Type Culture Collection
CI₅₀	Concentration inhibitrice de 50% de DPPH
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	concentration minimale inhibitrice
DMSO	Diméthylsulfoxyde
D.O	Densité Optique
DPPH	2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl
ERN	Espèces réactives azotés
ERO	espèces réactives oxygénées
FID	Fédération international de diabète
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power.
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography
HSV	Herpes simplex virus
MH	Muller Hinton
OMS	Organisation mondiale de la santé
PDA	Potatos Dextrose Agar
PDAac	Potatos Dextrose Agar acidifié

Listes des figures

Figure II.1	Image plan de racine, branche, fleur, et graine d' <i>A. halimus</i>	09
Figure II.2	Répartition géographique de l' <i>Ephedra</i> dans le monde.....	10
Figure II.2	Port général d' <i>Ephedra alata</i>	11
Figure IV.1	La partie aérienne des deux plantes	18
Figure IV.2	Localisation de la région de Beni abbès.....	19
Figure IV.3	Etapes du screening phytochimique.....	21
Figure IV.4	Les étapes du fractionnement des extraits aqueux d' <i>E.alata</i> et <i>A.halimus</i>	24
Figure IV.5	Schéma simplifié du principe de la méthode de l'aromatogramme.....	28
Figure IV.6	Schéma d'utilisation d'une microplaque.....	30
Figure IV.7	Principe d'évaluation d'activité antifongique par la méthode de croissance radiale.....	32
Figure V.1	Fréquences de différentes utilisations de l' <i>E.alata</i>	40
Figure V.2	Fréquences de différentes utilisations d' <i>A.halimus</i>	41
Figure V.3	mode de préparation des deux plantes.....	42
Figure V.4	Résultat de l'antibiogramme des souches isolées de l'hôpital Tourabi Boujamaa.....	47
Figure V.5	Résultats des diamètres (mm) des zones d'inhibition des extraits et fractions d' <i>A.halimus</i> (1mg/ml) sur les souches de références.....	52
Figure V.6	Résultats des diamètres (mm) des zones d'inhibition des extraits et fractions d' <i>A.halimus</i> (1mg/ml) sur les souches isolées	53
Figure V.7	Résultats des diamètres (mm) des zones d'inhibition d'extrait méthanolique, (1mg/ml) d' <i>E. alata</i>	54
Figure V.8	Photo de l'effet inhibiteur de l'extrait aqueux obtenue avec macération d' <i>E. alata</i> sur <i>Salmonella typhimurium</i>	55
Figure V.9	Résultats des diamètres (mm) des zones d'inhibition d'extrait aqueux (1mg/ml) d' <i>E.alata</i> obtenu avec macération.....	55
Figure V.10	Résultats des diamètres (mm) des zones d'inhibition d'extrait aqueux (1mg/ml) d' <i>E. alata</i> obtenu avec montage sous reflux	56
Figure V.11	Photo de l'effet inhibiteur de l'extrait aqueux d' <i>E. alata</i> obtenu avec montage sous reflux sur (a) <i>Bacillus subtilis</i> (b) <i>Bacillus cereus</i> , (c) <i>Enterococcus faecalis</i> et (d) <i>Citrobacter freundii</i>	56
Figure V.12	Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait obtenu avec montage sous reflux d' <i>E. alata</i> , en mm.....	57
Figure V.13	Résultats des diamètres (mm) des zones d'inhibition de fraction aqueuse (1mg/ml) d' <i>E. alata</i>	57
Figure V.14	Moyennes des indices antifongiques des différentes concentrations de l'extrait des alcaloïdes d' <i>E. alata</i> sur <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus flavus</i> et <i>Aspergillus ochraceus</i>	62

Figure V.15	Moyennes des indices antifongiques des différentes concentrations de la fraction aqueuse d' <i>E. alata</i> sur <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus flavus</i> et <i>Aspergillus ochraceus</i>	62
Figure V.16	Moyennes des indices antifongiques des différentes concentrations de l'extrait aqueux sous reflux d' <i>E.alata</i> sur <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus flavus</i> et <i>Aspergillus ochraceus</i>	63
Figure V.17	Moyennes des indices antifongiques des différentes concentrations des extraits aqueux sous reflux, alcaloïdes, flavonoïdes et fraction aqueuse d' <i>E. alata</i> sur <i>Aspergillus ochraceus</i>	63
Figure V.18	Moyennes des indices antifongiques des différentes concentrations des extraits aqueux macéré et aqueux sous reflux, alcaloïdes, flavonoïdes fraction aqueuse d' <i>E. alata</i> sur <i>Aspergillus flavus</i>	64
Figure V.19	Moyennes des indices antifongiques des différentes concentrations des extraits aqueux et aqueux sous reflux, alcaloïdes, flavonoïdes fraction aqueuse d' <i>E. alata</i> sur <i>Aspergillus niger</i>	64
Figure V.20	Moyennes des indices antifongiques des différentes concentrations des extraits aqueux et aqueux sous reflux d' <i>A.halimus</i> sur <i>Aspergillus flavus</i>	65
Figure V.21	Moyennes des indices antifongiques des différentes concentrations des extraits aqueux et aqueux sous reflux d' <i>A. halimus</i> sur <i>Aspergillus niger</i>	66
Figure V.22	Moyennes des indices antifongiques des différentes concentrations des extraits aqueux et aqueux sous reflux d' <i>A. halimus</i> sur <i>Aspergillus ochraceus</i>	66
Figure V.23	Moyenne des indices antifongiques des extraits des flavonoïdes d' <i>A.halimus</i> et d' <i>E. alata</i> à la concentration de 0,75 mg/ ml sur <i>Aspergillus ochraceus</i> et <i>Aspergillus flavus</i>	67
Figure V.24	Moyennes des indices antifongiques des extraits aqueux macérés d' <i>A. halimus</i> et d' <i>E. alata</i> à la concentration de 0,75 mg/ ml sur <i>Aspergillus niger</i> et <i>Aspergillus flavus</i>	67
Figure V.25	Moyennes des indices antifongiques des extraits sous reflux d' <i>A. halimus</i> et d' <i>E. alata</i> à la concentration de 0,75 mg/ ml sur <i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Aspergillus Niger</i> et <i>Aspergillus flavus</i>	68
Figure V.26	Réaction de piégeage des radicaux libres par DPPH.....	69
Figure V.27	Activité antioxydante des extraits et fractions d' <i>E. alata</i> et d'acide ascorbique.....	70
Figure V.28	Activité antioxydante des extraits et fractions d' <i>E.alata</i>	71
Figure V.29	Activité antioxydante des extraits d' <i>A.halimus</i> et d'acide ascorbique....	72
Figure V.30	Activité antioxydante des fractions d' <i>A.halimus</i>	73
Figure V.31	Pouvoir réducteur des extraits d' <i>E. alata</i> et de l'acide ascorbique, EC : extrait alcaloïdes et EL : extrait flavonoïdes.....	76
Figure V.32	Pouvoir réducteur des extraits d' <i>E. alata</i> et de l'acide ascorbique, EM:	

	extrait méthanolique, EA : extrait aqueux, EE : extrait acétate d'éthyle.	76
Figure V.33	Pouvoir réducteur des fractions d' <i>E.alata</i> et de l'acide ascorbique, Hx: fraction hexane, Ch : fraction chloroforme, Aq : fraction aqueuse et Ac : fraction acétate d'éthyle.....	77
Figure V.34	Figure V.34: Pouvoir réducteur des extraits d' <i>A.halimus</i> et de l'acide ascorbique. AM: extrait méthanolique, AA : extrait aqueux, AE : extrait acétate d'éthyle.....	78
Figure V.35	Pouvoir réducteur des extraits d' <i>A.halimus</i> et de l'acide ascorbique. AL : extrait flavonoïdes et AC : extrait alcaloïdes	78
Figure V.36	Pouvoir réducteur des fractions d' <i>A.halimus</i> et de l'acide ascorbique, Hx: fraction hexane, AAq : fraction aqueuse, Ch : fraction chloroforme et Ace : fraction acétate d'éthyle.....	78
Figure V.37	Les valeurs d'IC50 des extraits et fraction d' <i>E.alata</i> . EA : extrait aqueux, EE : extrait acétate d'éthyle, Hx: fraction hexane, Aq : fraction aqueuse et Ac : fraction acétate d'éthyle.....	79
Figure V.38	Les valeurs d'IC50 des extraits et fraction d' <i>A.halimus</i> . AM: extrait méthanolique, AA : extrait aqueux, AE : extrait acétate d'éthyle, AL : extrait flavonoïdes, Aaq : fraction aqueuse, et Ace : fraction acétate d'éthyle	80
Figure V.39	Pourcentages d'inhibition de l'enzyme α -amylase en fonction des différentes concentrations d'acarbose.....	81
Figure V.40	Pourcentages d'inhibition de l'enzyme α -amylase en fonction des différentes concentrations des fractions d' <i>E. alata</i>	82
Figure V.41	Pourcentages d'inhibition de l'enzyme α -amylase en fonction des différentes concentrations des extraits d' <i>E. alata</i>	83
Figure V.42	Pourcentages d'inhibition de l'enzyme α -amylase en fonction des différentes concentrations des extraits d' <i>A. halimus</i>	84
Figure V.43	Pourcentages d'inhibition de l'enzyme α -amylase en fonction des différentes concentrations des fractions d' <i>A. halimus</i>	85
Figure V.44	Valeurs des CI50 de l'inhibition de l'enzyme α -amylase par les extraits et fractions d' <i>E. alata</i> en comparaison avec l'acarbose	86
Figure V.45	Valeurs des CI50 de l'inhibition de l'enzyme α -amylase par les extraits et fractions d' <i>A. halimus</i> en comparaison avec l'acarbose	86
Figure V.46	Pourcentages d'inhibition de l'enzyme α -glucosidase en fonction des différentes concentrations d'acarbose.....	87
Figure V.47	Pourcentages d'inhibition de l'enzyme α -glucosidase en fonction des différentes concentrations des extraits d' <i>E. alata</i>	88
Figure V.48	Pourcentages d'inhibition de l'enzyme α -glucosidase en fonction des différentes concentrations des fractions d' <i>E. alata</i>	89

Figure V.49	Pourcentages d'inhibition de l'enzyme α -glucosidase en fonction des différentes concentrations des extraits d' <i>A. halimus</i>	90
Figure V.50	Pourcentages d'inhibition de l'enzyme α -glucosidase en fonction des différentes concentrations des fractions d' <i>A. halimus</i>	91
Figure V.51	Valeurs des CI50 de l'inhibition de l'enzyme α -amylase par les extraits et fractions d' <i>E. alata</i> en comparaison avec l'acarbose.....	92
Figure V.52	Valeurs des CI50 de l'inhibition de l'enzyme α -amylase par les extraits et fractions d' <i>A. halimus</i> en comparaison avec l'acarbose.....	92

Table des matières

Dédicace	
Remerciements.....	
<hr/>	
ملخص.....	I
Abstract	II
Résumé.....	III
Liste des abréviations	IV
Liste des tableaux.....	V
Liste des figures.....	VI
Sommaire.....	
<hr/>	
Introduction.....	01
<hr/>	
Synthèse bibliographique	
Chapitre I : Plantes médicinales	
I.1 Métabolites secondaires des plantes	04
I.2 Eléments actifs des plantes médicinales.....	04
I.2.1 Huiles essentielles	04
I.2.2 Alcaloïdes	05
I.2.3 Acides phénoliques	05
I.2.4 Tanins.....	05
I.2.5 Flavonoïdes	06
I.2.6 Coumarines.....	06
I.2.7 Anthocyanines	06
I.2.8 Polysaccharides	06
I.2.9 Glucosides cardiaques	06
I.2.10 Saponines	06
I.2.11 Vitamines et les minéraux	06
Chapitre II : Présentation des plantes étudiées	
II .1 <i>Atriplex halimus</i>	08
II.1.1 Position systématique	08
II.1.2 Répartition géographique.....	08

II.1.3 Description botanique	08
II.1.4 Propriétés et usages thérapeutiques d' <i>A. halimus</i>	10
II.1.5 Travaux antérieurs	10
II.2 <i>Ephedra alata</i>	10
II.2.1 Position systématique	10
II.2.2 Répartition géographique	10
II.2.3 Description botanique	11
II.2.4 Propriétés et usages thérapeutiques.....	11
II.2.5 Travaux antérieurs.....	11
<i>Chapitre III: Activités biologiques</i>	
III.1 Activité antimicrobienne.....	13
III.1.1 Méthodes de détermination de l'activité antimicrobienne.....	13
III.1.1.1 Méthode de disque	13
III.1.1.2 Méthode de diffusion en puits.....	13
III.1.1.3 Méthode de diffusion avec des cylindres d'agar	13
III.1.1.4 Méthodes de croissance radiale	15
III.1.1.5 Méthodes de dilutions en gélose et en bouillon.....	15
III.2 Activité antioxydante.....	15
III.2.1 Méthode de détermination de l'activité antioxydante	15
III.2.1.1 Méthode TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).....	15
III.2.1.2 Test DPPH (1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrozyl).....	15
III.2.1.3 Test de crocine.....	16
III.2.1.4 Méthode de TBA (Substances Reactive Acid Thiobarbuturic) et méthode de détermination des diènes conjugués.....	16
III.3 Activité antidiabétique.....	16
III.3.1 Méthode de détermination de l'activité antidiabétique.....	16
III.3.1.1 Etude in vitro.....	16
III.3.1.1.1 Test d'inhibition de l' α -amylase.....	16
III.3.1.1.2 Test d'inhibition de l' α -glucosidase.....	17
III.3.1.1.3 Détermination d'absorption du glucose in vitro	17
III.3.1.2 Etude in vivo	17

Chapitre IV : Matériel et méthodes

IV.1 Matériel végétal	18
IV.2 Présentation du site de récolte.....	18
IV.3 Enquête ethnobotanique.....	19
IV.4 Criblage phytochimique	19
IV.4.1 Préparation des extraits	20
IV.4.2 Réaction de caractérisation	20
IV.5 Extractions	21
IV.5.1 Extrait aqueux par macération.....	21
IV.5.2 Extrait aqueux sous reflux.....	22
IV.5.3 Extrait méthanolique et d'acétate d'éthyle.....	22
IV.5.5 Extraction des flavonoïdes.....	22
IV.5.6 Extraction des alcaloïdes totaux.....	23
IV.5.7 Fractionnement des extraits aqueux	24
IV.6 Activités biologiques des extraits et fractions <i>d'E. alata</i> et <i>A. halimus</i>	25
IV.6.1 Activité antimicrobienne	25
IV.6.1.1 Souches testées	25
IV.6.1.1.1 Souches bactériennes de référence et souches fongiques testées.....	25
IV.6.1.1.2 souches responsable des infections nosocomiales.....	25
IV.6.1.1.3 Vérification de la pureté des souches	26
IV.6.1.1.4 Conservation des souches	27
IV.6.1.2 Activité antibactérienne	27
IV.6.1.2.1 Préparation d'inoculum	27
IV.6.1.2.2 Antibiogramme.....	27
IV.6.1.2.3 Méthode de contacte directe	28
IV.6.1.2.4 Méthode de disque.....	28
IV.6.1.2.5 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide.....	29
IV.6.1.3 Activité antifongique.....	30
IV.6.1.3.1 Préparation de l'inoculum	30
IV.6.1.3.2 Principe.....	30
IV.6.1.2.3 Expression des résultats.....	31
IV.6.2 Activité antioxydante.....	32

IV.6. 2.1 Pouvoir antioxydant par test de DPPH.....	32
IV.6. 2. 1.1 Préparation de l'extrait à tester.....	32
IV.6.2.1.2 Préparation de la solution de DPPH dans le méthanol.....	33
IV.6.2.2 Méthode de FRAP (réduction de fer)	33
IV.6.3 Evaluation in vitro de l'activité antidiabétique.....	34
6.3.1 Test α -amylase.....	34
6.3.2 Test α -glucosidase.....	36
<i>Chapitre V : Résultats et discussion</i>	
V.1 Etude ethnobotanique.....	38
V.1.1 Informations générales sur les personnes enquêtées.....	38
V.1.2 Résultat de l'enquête.....	38
V.1.2.1 Connaissance des deux plantes.....	38
V.1.2.2 L'origine de l'information.....	39
V.1.2.3 L'utilisation thérapeutique des deux plantes	39
V.1.2.4 Partie utilisée	40
V.1.2.5 Mode de préparation	40
V.1.2.6 Dose utilisée.....	42
V.2 Tests phytochimiques.....	42
V.3 Rendements des extractions.....	45
V.4 Activités antimicrobiennes	46
V.4.1Activité antibactérienne	46
V.4.1.1 Résultat de l'antibiogramme.....	46
V.4.1.2 Méthodes de contact direct.....	49
V.4.1.3 Méthode de diffusion des disques.....	51
V.4.2Activité antifongique.....	60
V.5 Activité antioxydante.....	69
V.5.1 Pouvoir antioxydant par test de DPPH.....	69
V.5.2. Test de la réduction du fer FRAP	75
V.6 Activité antidiabétique.....	81
V.6.1Alpha-amylase.....	81
V.6.2 Alpha-glucosidase.....	87
Conclusion	95
Références bibliographiques	97

Annexes.....



Introduction générale

En Algérie, comme dans d'autres pays en développement, les maladies infectieuses et parasitaires constituent un problème en raison de leur fréquence et de leur gravité (**Bendahou et al., 2008**). Cette situation est d'autant plus préoccupante du fait de l'émergence de souches de micro-organismes résistantes aux antibiotiques et de l'émergence d'infections rares qui affectent les traitements médicamenteux actuels (**Vanden et Vlietinck, 1991**). Face aux nombreux obstacles apportés par l'utilisation des agents antibactériens existants, il est crucial de trouver de nouvelles substances antibactériennes efficaces aux effets à large spectre. L'une des stratégies de cette recherche consiste à explorer les plantes utilisées en médecine traditionnelle (**Biyiti et al., 2004**).

Les plantes produisent des centaines de milliers de composés différents avec des activités biologiques diverses et des rôles écologiques importants. Dans de nombreux cas, ces substances ou composés agissent comme des mécanismes de défense chimiques contre les insectes, les herbivores et les micro-organismes.

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires des végétaux. Permettant de résister aux diverses agressions. Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés. D'un point de vue thérapeutique, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve dans les plantes médicinales (**Macheix et al., 2005**).

L'utilisation de molécules antioxydantes synthétiques est actuellement remise en question en raison des risques toxicologiques potentiels. Aujourd'hui, de nouvelles sources végétales d'antioxydants naturels sont recherchées (**Tadhani et al., 2007**). En fait, le rôle des polyphénols en tant qu'antioxydants naturels suscite un intérêt croissant dans la prévention et le traitement du cancer, de l'inflammation et des maladies cardiovasculaires (**Vârban et al., 2009**). Ils sont également utilisés comme additifs dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques (**Bougandoura et Bendimerad, 2012**).

Le stress oxydatif est associé à une variété de maladies qui ont un impact dramatique sur la santé de la population. Ces maladies d'origine stress oxydatif sont souvent dues à une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et d'espèces réactives de l'azote (ERN), qui peuvent être toxiques pour les principaux composants cellulaires ; lipides, protéines et acides nucléiques (**Valko et al., 2006**). Cela conduit à un dysfonctionnement cellulaire et est associé à diverses maladies telles que les maladies cardiovasculaires, le cancer, le diabète, les maladies

neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson) et le processus de vieillissement (**Aruoma, 2003**).

De nombreuses études scientifiques ont été menées pour découvrir les propriétés fonctionnelles des composés d'origine végétale, des antioxydants ou d'autres composés pouvant être bénéfiques pour la santé (**Tumbas et al., 2010**).

Par ailleurs, le diabète sucré est l'une des cinq maladies métaboliques les plus courantes dans le monde (**Tripathi et Srivastava, 2006**). Le site de la Fédération internationale du diabète (**FID, 2017**) estime que 415 millions de personnes sont atteintes de diabète, et ce nombre devrait atteindre 642 millions d'ici 2040. Actuellement, les agents hypoglycémisants oraux, tels que la metformine, l'acarbose, les thiazolidinediones et les sulfonilurées, restent le pilier du traitement des patients diabétiques (**Gillies et al., 2007**).

Malheureusement, leur utilisation à long terme, y compris les sulfonilurées et la metformine, peut provoquer des effets secondaires tels que ballonnements, diarrhée et flatulences (**Al-douri 2000**).

Aujourd'hui, l'utilisation de produits antidiabétiques naturels ou de thérapies alternatives (y compris les remèdes à base de plantes) est entrée dans le traitement humain, en particulier dans les pays en développement, non pas parce qu'ils sont moins chers, mais en raison de leur capacité à réduire les effets secondaires de l'insuline et des agents hypoglycémiques oraux (**Ahmed et al. 2010**).

Pour notre part, nous nous sommes intéressés à deux espèces végétales *Atriplex halimus* et *Ephedra alata* qui sont largement utilisées en médecine traditionnelle.

Ephedra alata est utilisé depuis plus de 5000 ans dans la médecine traditionnelle chinoise pour traiter les allergies, l'asthme bronchique, les frissons, les rhumes, la toux, les œdèmes, la fièvre, la grippe, les maux de tête, le rhume et la congestion nasale (**Rustaiyan et al., 2011**).

Des recherches antérieures ont révélé que les extraits aqueux de cette plante présentent des propriétés anticancéreuses in vitro, qui ont induit, la réduction de la prolifération avec des tendances invasives, provoquant l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire, et la suppression de la tumorigenèse (**Shukla et Mehta, 2015**). Il a également été démontré qu'elle a des effets anti-inflammatoires, antibactériens, antioxydants, antidiabétiques, antiobésité et antiviraux (**Hyuga et al., 2016**).

Par ailleurs, la décoction des parties aériennes d'*E. alata* présente une activité anti-diabétogène in vitro et in vivo (**Lamine et al., 2019**). Les effets bénéfiques pour la santé des extraits végétaux d'*E. alata* sont à mettre au compte de la présence de substances pharmacologiquement actives, comme les alcaloïdes, les acides phénoliques, les flavonoïdes, les proanthocyanidines, les tanins, les saponines les sucres réducteurs et les glycosides cardiaques (**Ibragic et Sofic, 2015**).

En outre, *A. halimus* communément appelé "Guettaf" est un arbuste originaire de l'Afrique du Nord, appartient à la famille des Chenopodiaceae. Une espèce réputée pour la valeur nutritionnelle et énergétique de ses feuilles riches en fibres alimentaires (cellulose), protéines, vitamines (B et C) et sels minéraux (sodium, calcium, potassium, magnésium, phosphore) (**Frencllet et Le Houérou, 1971**).

Les extraits d'*A. halimus* sont généralement utiles dans le traitement de plusieurs problèmes de santé, les infections bactériennes telles que l'infection des voies urinaires. En outre, elle est classée parmi les plantes les plus utilisées pour traiter l'hyperglycémie (**Belouad, 2001**). En Algérie, il est largement utilisé en thérapie principalement pour le traitement de différents types de kystes "ovariens, utérins et mammaires" (**Ounaissia et al., 2020**).

Le genre *Atriplex* contient des acides organiques, des cardinolides et des flavonoïdes et des alcaloïdes et du phosphatidylglycérol (**Shalabia, 2011**).

Le présent travail vise à caractériser les contenus phytochimiques de deux plantes spontanées de la région de Bechar : *E. alata* et *A. halimus* et d'évaluer leur activité antibactérienne, antifongique antioxydante et antidiabétique.

Notre travail se repartie en trois parties : la première partie est une synthèse bibliographique où nous apportons des généralités sur les deux plantes et les composés phénoliques ainsi les activités biologiques des plantes. La deuxième partie est la partie expérimentale qui est consacrée à l'extraction des extraits et fractions à partir les deux plantes puis étudiée certains de leurs activités biologiques et une troisième partie montrant les résultats trouvés et leur discussion. Enfin, une conclusion qui résumera tous les résultats obtenus et quelque perspective.

Chapitre I

Plantes médicinales

Les plantes en tant que source de composés médicinaux ont continué à jouer un rôle dominant dans le maintien de la santé humaine depuis l'antiquité. Selon l'organisation mondiale de la santé, les extraits de plantes ou leurs constituants actifs sont utilisés comme médecine populaire dans les thérapies traditionnelles de 80% de la population mondiale (**Kirbag et al., 2009**).

I.1 Métabolites secondaires des plantes

Les plantes sont des organismes sessiles qui doivent faire face à des changements dans leur environnement. Le métabolisme se trouve à une interface entre la perception des signaux environnementaux et leur traduction (**Wink, 2003**). Bien que les métabolites primaires (exemple : les acides aminés, les glucides) définis comme essentiels à la physiologie des plantes soient relativement peu nombreux, les métabolites secondaires sont particulièrement diversifiés (**Croteau et al., 2000**).

les métabolites secondaires jouent un rôle important dans les interactions entre la plante et son environnement (**Groppa et Benavides , 2008**), étant impliqués dans la protection contre les stress environnementaux, la concurrence ou l'attraction des pollinisateurs (**Wahid et Ghazanfar, 2006**). On a trois grandes catégories de métabolites secondaires les terpènes (comme les caroténoïdes et les stérols), les composés phénoliques (comme les acides phénoliques, les coumarins, les lignanes, les flavonoïdes, les tannins et la lignine) et les composés contenant de l'azote (comme les alcaloïdes et les glucosinolates) (**Havsteen, 2002**).

I.2 Eléments actifs des plantes médicinales

I.2.1 Huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des produits obtenus par distillation à l'eau ou à la vapeur, par traitement mécanique ou par distillation sèche de matières naturelles. Elles se présentent comme des mélanges liquides, volatiles, limpides et colorés de plusieurs composés aromatiques (**Fengfeng et al., 2017**). Comme pour les autres métabolites végétaux, le rôle des HE est la protection de l'organisme végétal contre certains micro-organismes pathogènes. D'autre part, elles peuvent également attirer certains insectes pour favoriser la dispersion des pollens et des graines. Ainsi, les HE peuvent jouer un rôle dans la médiation des interactions des plantes avec l'environnement (**Bakkali et al., 2008**).

L'activité antibactérienne, antioxydantes et anti-inflammatoires des huiles essentielles extraites de plantes aromatiques ont été largement décrites in vitro et

possèdent de fortes propriétés antifongiques (**Juhas, 2009**). Elles sont utilisées dans de nombreux domaines : pharmacie, cosmétique, agro-alimentaire (**Kaloustian et al., 2008**).

I.2.2 Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont une classe relativement importante de métabolites végétaux secondaires spécialisés, qui se compose d'un grand nombre de composés azotés structurellement diversifiés (**Wink, 2011**). De nombreuses alcaloïdes, telles que la caféine, la nicotine et la morphine, sont économiquement importantes car elles se trouvent dans les aliments, les boissons et les produits pharmaceutiques (**Roberts, 2013**).

I.2.3 Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des métabolites secondaires végétaux largement répandus dans le règne végétal. Les acides phénoliques sont des dérivés de l'acide benzoïque ou de l'acide cinnamique.

Les principales sous-classes d'acides phénoliques comprennent les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques (**Cheyrier, 2005**).

I.2.4 Tanins

Les tanins sont des métabolites secondaires polyphénoliques de poids moléculaire supérieur. Ils vont de (500-3000 Dalton) qui peuvent se classer en deux groupes de tanins hydrolysables et tanins non hydrolysables ou condensés (**Chung et al., 1998**). De plus, il existe un autre groupe de tannins, les phlorotannins, rarement consommés par les humains. On ne le trouve que dans les algues brunes (**Ragan et Glombitza, 1986**).

Le rôle biologique des tanins est peu connu, mais Leur présence donne à la plante des propriétés astringente, antiseptique, antioxydante et antidiarrhéique (**Vivas, 2002**).

I.2.5 Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont une classe de composés phénoliques qui, avec les caroténoïdes et la chlorophylle donnent de la couleur à de nombreuses espèces de fleurs et de fruits. Les flavonoïdes ne se produisent que dans les plantes où ils sont principalement présents sous forme de glycosides (**El Gharras, 2009**). Dans lesquels un ou plusieurs groupes hydroxyles de phénols sont combinés avec des sucres

réducteurs. Les flavonoïdes sont également associés à un large éventail d'effets biologiques sur la santé, y compris les activités antibactériennes, anti-inflammatoires, antiallergiques et antithrombotiques (**Pyrzynska et Biesaga, 2009**).

I.2.6 Coumarines

Les coumarins, isolés pour la première fois de la plante Coumarou (*Dipteryx odorata*), sont des composés naturels appartenant à la famille des benzopyrones. La coumarine est un composé actif volatil naturel présent dans de nombreuses plantes et il montre une vaste activité biologique (**Jinbing et al., 2012**).

I.2.7 Anthocyanines

Les anthocyanes sont responsables des couleurs cyanotiques allant du rose, du rouge et du violet au bleu foncé de la plupart des fruits, des fleurs et des feuilles (**Andersen et Markham, 2006**).

I.2.8 Polysaccharides

Ce sont des unités complexes de molécules de sucre présentes dans toutes les plantes. D'un point de vue phytothérapeutique, le polysaccharide le plus important est le mucilage (**Iserin, 2001**).

I.2.9 Glucosides cardiaques

Les glycosides cardiaques sont des stéroïdes ayant la capacité d'exercer une action puissante spécifique sur le muscle cardiaque. Une très petite quantité peut exercer une stimulation bénéfique sur le cœur malade. Ces composés sont principalement précieux dans le traitement de l'insuffisance cardiaque congestive. Ils augmentent la force de la contraction cardiaque (**Farnsworth, 1966**).

I.2.10 Saponines

Les saponines sont un groupe de terpénoïdes présents dans les plantes, y compris l'oignon, le gingembre, l'ail et les légumineuses (**Sauvaire et coll, 1996**). Les saponines ont des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes et présentent des effets immunomodulateurs liés au cancer (**Avato et coll, 2006**).

I.2.11 Vitamines et les minéraux

Bien qu'elles soient souvent négligées, de nombreuses plantes médicinales sont particulièrement riches en vitamines (**Iserin, 2001**).

Ce qui concerne les minéraux, De nombreuses plantes médicinales sont très riches en minéraux, on peut citer par exemple le persil frisé ou la grande ortie **(Bruneton, 1999)**.

Chapitre II

Présentation des plantes étudiées

II.1 *Atriplex halimus*

II.1.1 Position systématique

Embranchement : Spermaphytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Famille : Chénopodiaceae

Genre : *Atriplex*

Espèce : *Atriplex halimus* (Guignard et Dupont, 2004).

II.1.2 Répartition géographique

Les *Atriplex* sont situés dans les zones tempérées, méditerranéennes et subtropicales, entre 20 et 50° d'altitude nord et sud (Le Houérou, 1992). Dans le monde, on trouve des *Atriplex* de l'Alaska à la Patagonie, de la Bretagne à la Sibérie et de la Norvège à l'Afrique du Sud (Franclet et Le Houérou, 1971).

L'espèce est spontanée dans une zone relativement vaste englobant les pays d'Afrique du Nord et du Proche et Moyen-Orient des Canaries à l'Iran. En Europe, l'*Atriplex halimus* est présent en Bulgarie en plus de la zone méditerranéenne.

En Afrique du Nord, le genre *Atriplex* comprend 15 espèces spontanées. Ces espèces sont divisées en 9 espèces vivaces, une espèce bisannuelle et 9 espèces annuelles. Parmi les espèces les plus utilisées en Afrique du Nord se trouve *Atriplex halimus* (Papanastasis, 2000). En Algérie, l'*Atriplex* est spontané dans les zones semi-arides et arides (Nedjimi, 2012).

II.1.3. Description botanique

Atriplex est une plante arbustive appartenant à la famille des Amarantacées qui comprend environ 417 espèces dans le bassin méditerranéen (Le Houérou, 1992).

Atriplex halimus est un arbuste halophyte de 1 à 3 m de haut, très branchu, formant des touffes qui peuvent atteindre 1 à 3 m de diamètre. Il est caractérisé par la présence de tiges, de feuilles et de fleurs. Elle pousse sur une variété de sols, de texture fine à grossière, avec divers degrés de salinité (Walker et al., 2014).



Racines d'*A. halimus*



Fleurs d'*A. halimus*



Branches d'*A. halimus*



Graines d'*A. halimus*

Figure II.1 : Image plan de racine, branche, fleur, et graine d'*A. halimus* (Guettoche, 2021).

II.1.4 Propriétés et usages thérapeutiques d'*A. halimus*

Dans l'alimentation humaine, *A. halimus* est un arbuste connu pour la valeur nutritive et énergétique de ses feuilles tendres, non seulement pour le bétail, mais aussi comme nourriture pour les nomades et la population locale. En effet, au printemps, dans plusieurs régions d'Algérie (Djelfa) et de Tunisie (Gabes), les jeunes pousses de guettaf sont consommées par l'homme, en le préparant comme des épinards (Nedjimi et al., 2013).

En économie, la plantation d'*Atriplex* semble être l'un des meilleurs moyens de réhabiliter les zones désertiques et de les remettre en production. Il peut fournir des sources de fourrage avec une bonne valeur nutritionnelle pendant les saisons sèches, et les périodes de rareté des ressources de pâturage. En outre, il peut contribuer à la valorisation des sols marginaux et dégradés (Le Houreau, 1992).

En médecine traditionnelle, la population des steppes utilise *A. halimus* à des fins thérapeutiques principalement pour traiter l'hyperglycémie chez les patients diabétiques (Nedjimi et al., 2013). Il est également utilisé pour traiter l'inflammation des voies urinaires, de la cystite ovarienne et mammaire et des lithiases urinaires (Emam, 2011).

II.1.5 Travaux antérieurs

Une recherche de métabolites secondaires dans *Atriplex* a révélé la présence de phénols totaux, des saponines glycosides, des alcaloïdes, des tannins, des résines, des betaines et des flavonoïdes dont les flavonols constituent la classe chimique majeure chez la plupart des espèces *Atriplex* (Bylka et al., 2004; Abd El-Rahman et al., 2006; Benhammou et al., 2009). Parmi les flavonols aglycones identifiés : kaempferol, quercétine, isorhamnetine, parfois patuletine, spinacétine et tricine. Lekaempférol 3-O-sulphate-7-O-arabinopyranoside et quercétine 3-O-sulphate-7-O-arabinopyranoside ont été isolés dans les feuilles d'*A.hortensis* et la naringine, naringenine 7-O-glucoside, isorhamnetine 3-Orhamnosyl (1-6) glucopyranoside et isorhamnetine 7-Oglucopyranoside dans l'espèce *A. farinosa* (Bylka et al., 2001).

II.2 *Ephedra alata*

II.2.1 Position systématique

Embranchement : Spermaphytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Famille : Chénopodiaceae

Genre : *Atriplex*

Espèce : *Atriplex halimus* (Guignard et Dupont, 2004).

II.2.2 Répartition géographique

Le genre est originaire des latitudes tempérées et subtropicales en Europe, en Asie et en Amérique du Nord. En Asie, on le trouve en Arabie saoudite, en Irak, en Iran, en Palestine, au Liban, en Jordanie et en Syrie. En Afrique, on trouve l'*Ephédra alata* en Algérie, en Égypte, en Libye, au Maroc, en Tunisie, en Mauritanie, au Tchad et au Mali. (Al-Snafi, 2017)(Figure II.2).

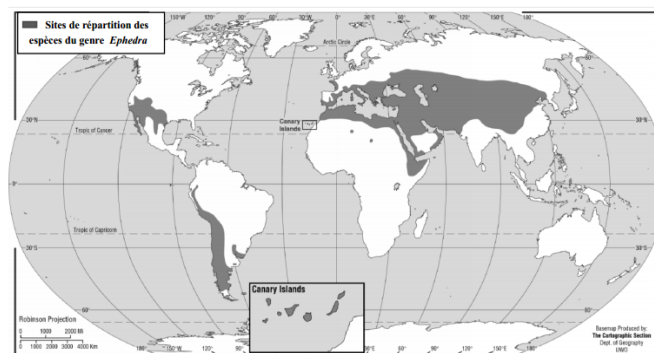


Figure II.2: Répartition géographique de l'*Ephedra* dans le monde (Caveney et al., 2001).

II.2.3 Description botanique

C'est l'un des arbustes des régions sahariennes, et c'est aussi une nanophanérophite au sens de Raunkiaer (1934). C'est un arbuste vivace rigide, jauneverd, abondamment ramifié qui pousse de 40 à 100 cm de haut et qui est généralement plus large que grande. Les rameaux sont articulés et ont des écailles qui sont diminuées et opposées aux nœuds des feuilles. Les fleurs mâles et femelles se tiennent normalement sur des pieds séparés. Des individus portant deux types de fleurs ont été observés dans certaines circonstances (Hadjadj et al., 2017).



Figure II.3 : Port général d'*Ephedra alata* (HADJADI, 2020).

II .2.4 Propriétés et usages thérapeutiques

L'Ephédraa une longue histoire d'usage thérapeutique, grâce à la présence de plusieurs alcaloïdes, y compris l'éphédrine. *Ephedra* a été utilisé dans la médecine depuis au moins 2700 B.C., quand les chinois l'ont employé pour guérir l'asthme, la toux, et la bronchite (*Ephedra sinica*).*Ephedra* a un parfum fort et une saveur dure. La tige séchée est le composant de la plante qui est le plus couramment utilisé pour ses propriétés médicinales (Chebouat et al., 2016).

II.2.5 Travaux antérieurs

E.alata s'est avéré avoir une activité antivirale élevée contre le HSV (virus de l'herpès simplex) (Soltan et Zaki, 2009). Les extraits aqueux d'*E. alata* d'Egypte ont un potentiel d'inhibition significatif in vitro et in vivo pour la croissance d'*Aspergillus flavus* et la production d'aflatoxine (Al-Qarawietal., 2011). Ghanem et El-Magly (2008) ont montré que l'extrait acétonitrile de l'*E. alata* de l'Egypte présente simultanément, une forte activité contre des bactéries à GRAM+ et à GRAM- ainsi que des champignons et levures.

Kessal et Bouafia (2003) et Chebouatet al. (2014) ont testé *E. alata* de la région de Ouargla, il est avéré avoir une activité plus ou moins significative contre la croissance des bactéries Gram-positives et Gram-négatives, selon la souche cible.

- Une étude menée par Boozer et al. (2001) a montré qu'un mélange d'éphédra et de guarana était efficace pour favoriser la perte de poids à court terme (8 semaines) chez les sujets en surpoids.

Chapitre III

Activités biologiques

III.1 Activité antimicrobienne

Depuis quelques années, on s'intéresse de plus en plus à la recherche et au développement de nouveaux agents antimicrobiens provenant de diverses sources pour lutter contre la résistance microbienne. Par conséquent, une plus grande attention a été accordée aux méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne.

III.1.1 Méthodes de détermination de l'activité antimicrobienne

III.1.1.1 Méthode de disque

Le test de diffusion sur disque d'agar mis au point en 1940 (**Heatley, 1944**), est la méthode officielle utilisée dans de nombreux laboratoires de microbiologie clinique pour les tests de sensibilité aux antimicrobiens de routine. De nos jours, de nombreuses normes acceptées et approuvées sont publiées par l'Institut des Normes Cliniques et de Laboratoire (CLSI) pour les tests de bactéries et de levures.

Dans cette procédure bien connue, les plaques de gélose sont inoculées avec un inoculum normalisé du micro-organisme d'essai. Ensuite, des disques de papier filtre (6 mm de diamètre), contenant le composé d'essai à la concentration désirée, sont placés sur la surface de l'agar. Les boîtes de Pétri sont incubées dans des conditions appropriées. En général, l'agent antimicrobien se diffuse dans la gélose et inhibe la germination et la croissance du micro-organisme d'essai, puis les diamètres des zones de croissance d'inhibition sont mesurés (**CLSI, 2012**).

III.1.1.2 Méthode de diffusion des puits d'agar

La méthode de diffusion du puits d'agar est largement utilisée pour évaluer l'activité antimicrobienne des plantes ou des extraits microbiens. Tout comme pour la méthode de diffusion par disque, la surface de la gélose est inoculée en répandant un volume de l'inoculum microbien sur toute la surface de la gélose. Ensuite, un trou d'un diamètre de 6 à 8 mm est perforé aseptiquement à l'aide d'une sonde stérile ou d'une pointe, et un volume (20 à 100 μL) de l'agent antimicrobien ou de la solution d'extrait à la concentration désirée est introduit dans le puits. Ensuite, les plaques d'agar sont incubées dans des conditions appropriées en fonction du microorganisme d'essai. L'agent antimicrobien se diffuse dans le milieu gélosé et inhibe la croissance de la souche microbienne testée (**Valgas et al., 2007**).

III.1.1.3 Méthode de diffusion avec cylindres d'agar

La méthode de diffusion avec cylindres d'agar est souvent utilisée pour mettre en évidence l'antagonisme entre microorganismes. La procédure consiste à faire une

culture d'agar de la souche d'intérêt sur son milieu de culture approprié par des stries serrées sur la surface de la boîte. Pendant leur croissance, les cellules microbiennes sécrètent des molécules qui se diffusent dans le milieu gélosé. Après incubation, un cylindre de gélose est coupé aseptiquement avec un perceur de liège stérile et déposé sur la surface de gélose d'une autre boîte préalablement inoculée par le microorganisme d'essai. Les substances diffusent du cylindre au milieu gélosé. Ensuite, l'activité antimicrobienne des molécules microbiennes sécrétées est détectée par l'apparition de la zone d'inhibition autour du cylindre d'agar (**Jiménez-Esquilín et Roane, 2005**).

III.1.1.4 Méthode de croissance radiale

La méthode de croissance radiale est principalement utilisée pour évaluer l'effet antifongique contre les moisissures, dans laquelle l'extrait à tester est incorporée à l'agar et alors un disque mycélien activement grandissant est placé au centre de la boîte de Pétri. La croissance radiale du mycète après un temps approprié, selon les caractéristiques de croissance du mycète, est alors mesurée et comparée aux échantillons témoins (**Wilkinson, 2006**).

III.1.1.5 Méthodes de dilutions en gélose et en bouillon

-Méthodes de dilutions en gélose

La méthode de dilution en gélose consiste à incorporer diverses concentrations souhaitées de l'agent antimicrobien dans un milieu gélosé (milieu gélosé en fusion), habituellement à l'aide de deux-dilutions multiples, suivies de l'inoculation d'un inoculum microbien défini sur la surface de la gélose. Cette technique convient aux essais de sensibilité antibactérienne et antifongique. Si plusieurs isolats sont testés contre un seul composé, ou si le composé (ou l'extrait) testé masque la détection de la croissance microbienne dans le milieu liquide avec sa coloration, la méthode de dilution par gélose est souvent préférée à la dilution en bouillon pour la détermination de la CMI (**Balouiri et al., 2016**).

-Méthode de dilution en bouillon

La micro-dilution ou la macrodilution du bouillon est l'une des méthodes les plus élémentaires de dépistage de la sensibilité aux antimicrobiens. La procédure consiste à préparer des dilutions de l'agent antimicrobien (exemple : 1, 2, 4, 8, 16 et 32 µg/ml) dans un milieu de croissance liquide distribué dans des tubes contenant un volume minimal de 2 mL (macrodilution) ou avec de plus petits volumes à l'aide d'une

plaque de micro-titration à 96 puits (microdilution). Ensuite, chaque tube ou puits est inoculé avec un inoculum microbien préparé dans le même milieu après dilution de la suspension microbienne normalisée ajustée à l'échelle de 0,5 Mc Farland. Après un bon mélange, les tubes inoculés ou la plaque de microdilution à 96 puits sont incubés dans des conditions appropriées en fonction du micro-organisme d'essai (**Balouiri et al., 2016**).

III.2 Activité antioxydante

III.2.1 Méthode de détermination de l'activité antioxydante

Il existe différentes méthodes physico-chimiques pour évaluer l'activité antioxydante des extraits naturels.

III.2.1.1 Méthode TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)

Le test de la capacité antioxydante équivalente au trolox (TEAC) est basé sur le piégeage du radical 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS), qui est converti en un produit incolore. Le degré de décoloration induit par un composé est rapporté à celui induit par le trolox, ce qui donne la valeur TEAC (**Mariken et al., 2004**).

III.2.1.2 Test DPPH (1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)

La méthode DPPH est l'essai le plus fréquemment utilisé pour l'évaluation de la capacité de balayage des radicaux libres des extraits végétaux. Le mécanisme de réaction implique le transfert d'un composé phénolique au radical DPPH. L'interaction du radical DPPH (de couleur pourpre) avec un composé phénolique, capable de neutraliser son caractère de radical libre, conduit à la formation d'hydrazine jaune incolore et l'effet obtenu peut être quantifié par spectrophotométrie à 515 nm (**Vladimir-Knežević et al., 2012**).

III.3.1.3 Test de crocine

La crocine est un caroténoïde situé dans le stigmaté soluble dans l'eau du safran (safran). Le dosage de la crocine est basé sur l'oxydation d'une solution de crocine ce qui entraîne une perte de couleur due à la présence de radicaux libres tels que l'ABAP (Azobisisobutyramidine dichlorohydrate). Le suivi de la décoloration de la crocine se fait par les mesures de l'absorbance à 450 nm (**Fasseas et al., 2007**).

III.3.1.4 Méthode de TBA (Substances Reactive Acid Thiobarbuturic) et méthode de détermination des diènes conjugués

Les méthodes les plus populaires utilisées pour la quantification des produits d'oxydation des lipides sont l'essai des diènes conjugués et l'essai des substances thiobarbituriques réactives aux acides (TBARS) (Gobert et al., 2014). Les deux méthodes évaluent par spectrophotométrie l'étendue de l'oxydation des lipides. La méthode des diènes conjugués est basée sur la forte absorbance UV de la fraction CD à 234 nm au maximum, tandis que le test TBARS quantifie le malonaldéhyde et les produits de type malonaldéhyde (trans, trans-2,4- heptadienal, trans-2-heptenal, trans-2-hexenal et hexanal) avec un maximum de 532 nm (Craft et al., 2012).

III.3 Activité antidiabétique

III.3.1 Méthode de détermination de l'activité antidiabétique

III.3.1.1 Etude in vitro

III.3.1.1.1 Test d'inhibition de l' α -amylase

L'inhibition de l' α -amylase par les extraits est basée sur la méthode de couleur amidon-iodé. Différentes concentrations d'extraits a ajouté de solution d' α -amylase et incubés. Ensuite, a ajouté l'amidon 0,1% à chaque tube à essai et incubés, puis a ajouté HCl (1 M) pour arrêter la réaction enzymatique suivie par l'addition de solution IKI. Le changement de couleur a été noté et l'absorbance a été lue à 630 nm. Les résultats ont été définis en tant que % d'inhibition (Dehimat et al., 2021).

III.3.1.1.2 Test d'inhibition de l' α -glucosidase

La solution d'échantillon (extraits ou acarbose) ont été ajoutés de tampon phosphate, α -glucosidase (dans un tampon phosphate) ont été ajoutés à chaque tube à essai, puis de solution de p-nitrophényl- α -D-glucopyranoside (préparée dans un tampon phosphate) ont été mélangés et incubés pendant 15 min à 37 °C, une solution de carbonate de sodium (0,2 M) ont ensuite été ajoutée. La lecture des absorbances a été mesurée à 405 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques réglé à 37 °C contre un blanc (Kasabri et al., 2011).

III.3.1.1.3 Détermination d'absorption du glucose in vitro

Une solution de glucose a été ajoutée à une tubulure de dialyse (10 cm x 11 mm) qui a été scellée aux deux se termine, et dialysé contre NaCl, La température optimale pour un maximum la diffusion du glucose a été établie à 37 °C. Secousse douce ainsi qu'un incubateur à agitation ont été utilisés pour simuler l'effet des contractions sur l'absorption intestinale du glucose. Le point final de l'équilibre de diffusion du glucose (glucose diffusion dans la solution externe) a été trouvé par mesurer la teneur en glucose de la solution externe dans le dialysat à intervalles de 0, 3, 6, 18 et 24 h.

Concentrations de glucose ont été mesuré en double par échantillon ponctuel dans le temps. Le test a été contrôlé en interne à l'aide de solutions de glucose 5 Mm préparé avec les échantillons de glucose expérimentaux. Gomme de guar 50 mg / ml ou EI végétaux 10, 25 et 50 mg / ml dans 0,22 M de glucose en triple ont été dialysés contre 0,15 M NaCl pendant une nuit à 37 ° C sous agitation douce et un contrôle parallèle (négatif) sans plante a été inclus (**Kasabri et al., 2011**).

III.3.1.2 Etude in vivo

Les modèles animaux de diabète représentent un outil important dans l'investigation du diabète qui nous aide pour éviter des études inutiles et éthiquement difficiles sur des sujets humains, ainsi que obtenir un point de vue scientifique complet de cette maladie. Bien qu'il existe plusieurs méthodes à travers lequel le diabète peut être induit (**De Carvalho Nestor et al., 2003**).

Le diabète sucré expérimental chez les animaux de laboratoire peut être induit en utilisant manipulation chimique, chirurgicale et génétique / immunologique. Cela peut également être considéré comme un des méthodes de classification du diabète expérimental, qui est dans ce cas basé sur méthode d'induction (**Kim et al., 2002**). Le produit chimique le plus important et le plus fréquemment utilisé pour l'induction du diabète expérimental sont l'alloxane et la streptozotocine (**Lenzen, 2008**).

Matériels et méthodes

Les plantes constituent une partie importante des soins de santé. L'utilisation accrue de plantes médicinales est le résultat de la preuve thérapeutique confirmée des plantes médicinales. Cela a été renforcé par les conséquences de l'accès limité aux services de santé modernes dans la plupart des pays en développement, le coût élevé de la médecine moderne par rapport aux plantes médicinales, acceptation socioculturelle de la médecine traditionnelle et croyance que les produits naturels ne présentent aucun risque.

Dans ce contexte, ce travail s'intéresse à la valorisation de deux plantes médicinales (*E.alata* et *A.halimus*) par l'étude de ses activités antimicrobiennes antioxydantes et antidiabétiques.

IV.1 Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé correspond à la partie aérienne composée des rameaux et des feuilles des espèces *E.alata* et *A.halimus*. La récolte s'est effectuée le 24/01/ 2017 au niveau de la localité de Béni abbés. Le séchage s'est fait à la température ambiante, à l'abri de la lumière et de l'humidité afin d'éviter la dégradation des principes actifs et le développement des moisissures (figure IV.1). Après séchage, les deux plantes ont été broyées et stockées dans un endroit sec en vue de leurs analyses.



Figure IV.1 : La partie aérienne de deux plantes. (a) : *A.halimus*, (b) : *E.alata*.

IV.2 Présentation du site de récolte

L'oasis de Béni Abbès, faisant partie de la Saoura. Elle se situe dans le Sahara occidental de l'Algérie, à environ 240 km au Sud-Ouest de la wilaya de Béchar et à 1200 Km au Sud Ouest d'Alger (figure IV.2). La vallée de la Saoura résultant de la jonction des oueds Guir et la Zouzfana, représente un principal cours d'eau du Sahara Nord Occidental de l'Algérie. Le climat de la région est aride avec une pluviométrie faible (Merzougui et al., 2021).

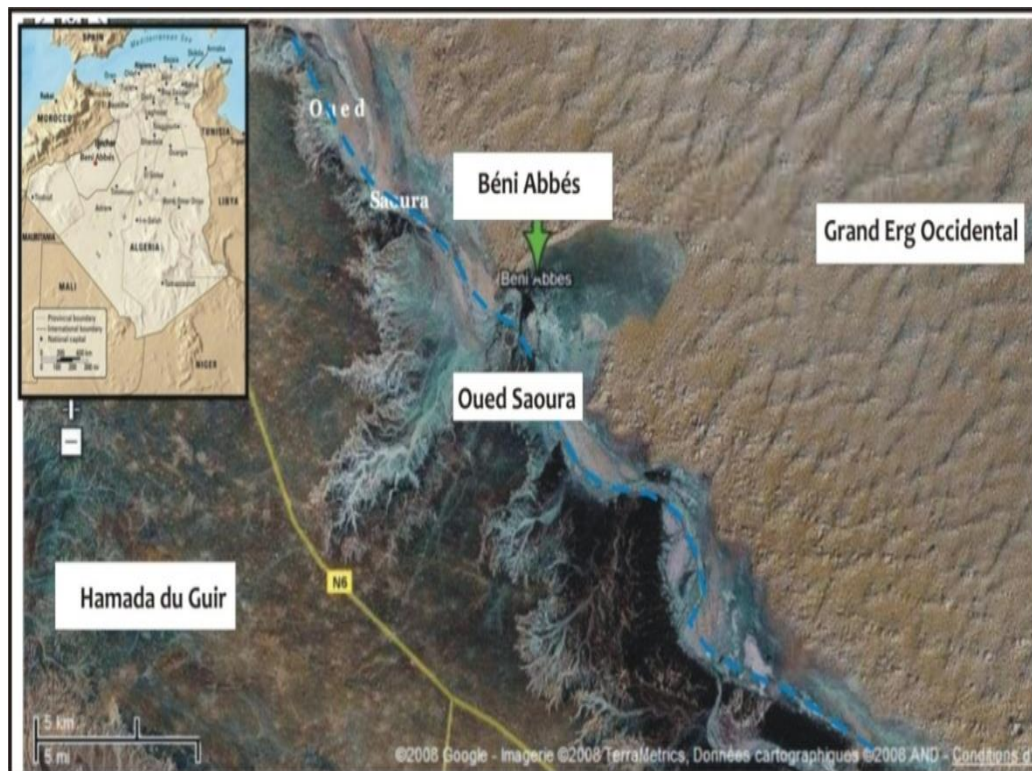


Figure IV.2: Localisation de la région de Beni abbés (Merzougui et al., 2008).

IV.3 Enquête ethnobotanique

Les enquêtes ethnobotaniques se concentrent sur le lien complexe entre les habitants locaux et les plantes locales, y compris les pratiques et les croyances culturelles associées aux différentes formes d'utilisation. Les plantes médicinales sont indispensables, dans le monde, de 35 000 à 70 000 espèces végétales sont utilisées en médecine populaire.

Dans les pays en développement, 60 à 80 % de la population dépend encore de médicaments à base de plantes, car ils constituent une alternative économique et sûre à la médecine allopathique souvent inaccessible. Même dans les pays développés, les plantes médicinales sont largement utilisées, par exemple, 30 à 50 % de la population en Chine, 40 à 50 % en Allemagne, 48 % en Australie, 42 % aux États-Unis et 49 % en France ont

déclaré utiliser les plantes médicinales comme soins de santé complémentaires (**Heinrich et al., 2006**).

Le but de notre étude était d'identifier les différentes utilisations thérapeutiques traditionnelles des deux plantes médicinales : *E.alata* et *A.halimus*, et documenter cette connaissance liée à l'utilisation de ces plantes au niveau de la wilaya de Béchar à l'aide d'une fiche ethnobotanique soumise à 500 enquêtés de 18 à 78 ans (272 hommes et 228 femmes). (La fiche d'enquête est présentée en Annexe 1).

IV.4 Criblage phytochimique

Il s'agit d'une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration et/ou de précipitation (**Yemoa et al., 2008**). L'extraction des différentes familles de composés chimiques nécessite l'utilisation des solvants de polarités différentes (eau, éther de pétrol et méthanol) (Figure IV.3).

Les saponosides, stérols et stéroïdes, flavonoïdes, tanins, coumarines, alcaloïdes, anthracénosydes, anthocyanosides et les émodols sont identifiés grâce aux tests phytochimiques qualitatifs.

IV.4.1 Préparation des extraits

Les plantes ont été broyées à l'aide d'un mortier jusqu'à l'obtention d'une poudre fine et homogène. Trois extractions ont été réalisées selon le protocole développé par **Nemlin et Brunel (1995)**.

IV.4.2 Réaction de caractérisation

Il s'agit d'une analyse qualitative (Annexe 2) basée sur des réactions de coloration et/ou de précipitation.

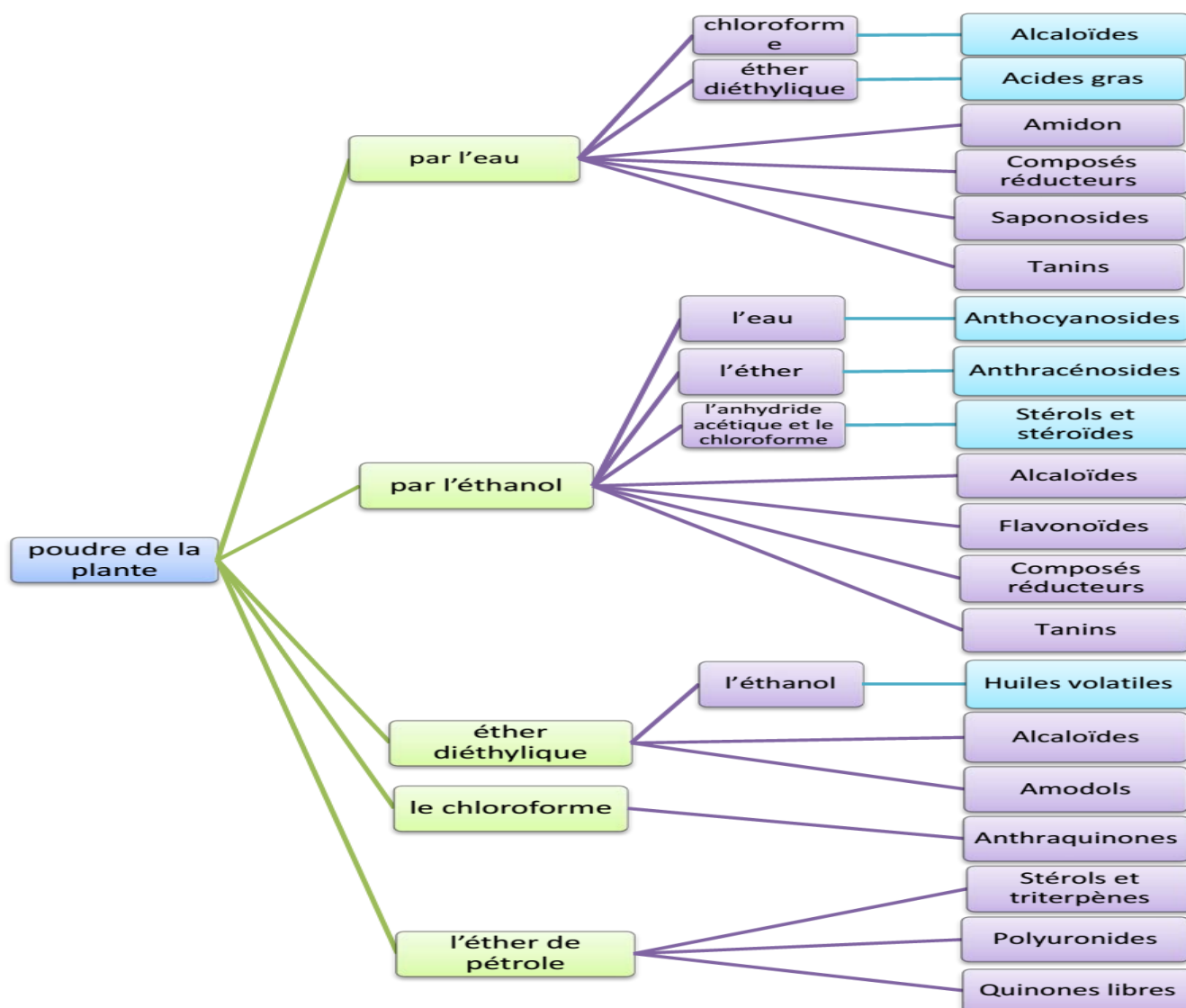


Figure IV.3: Etapes du screening phytochimique (Makhloufi, 2012).

IV.5 Extractions

IV.5.1 Extrait aqueux par macération

Dix grammes de poudre de plante a été porté à macération pendant 24 heures dans 100 ml d'eau distillée à température ambiante. Le mélange a ensuite été filtré en utilisant un papier-filtre, L'eau est éliminée du filtrat par évaporation sous pression réduite dans un rota-vapeur à 75°C.

IV.5.2 Extrait aqueux sous reflux

Dix grammes de poudre de plante a été mis sous reflux pendant 1 heure dans 100 ml d'eau distillée. Le mélange a ensuite été filtré en utilisant un papier-filtre, L'eau est éliminée du filtrat par évaporation sous pression réduite dans un rota-vapeur à 75°C.

IV.5.3 Extrait méthanolique et d'acétate d'éthyle

Dix grammes de poudre de plante a été mis dans 100 ml de méthanol ou d'acétate d'éthyle dans un montage à reflux pendant 1 heure. L'extrait est filtré et séché à 65 °C.

- Après évaporation, le résidu obtenu est déterminé en poids pour calculer le rendement. Le pourcentage a été calculé par la formule suivante :

$$R(\%) = (M / M_0) \times 100$$

R (%) : Rendement exprimé en %.

M: Masse en gramme de l'extrait sec résultant

M0 : Masse en gramme du matériel végétal à traite

➤ Concentrations des différents extraits

Une solution-mère de concentration de 10 mg/ml est obtenue par dissolution de 1 g de l'extrait sec de chaque plante dans 100ml d'eau distillée stérile. Des volumes de 0,5 ml, 0,75 ml, 1ml, 1,25 ml, 1,5 ml sont pris et complétés jusqu'à 15 ml par l'eau distillée stérile; la gamme des concentrations finales ainsi obtenues correspond à 0,333mg/ml -0.5mg/ml 0,666mg/ml – 0.833 mg/ml et 1mg/ml

Pour l'activité antifongique des volumes de 0,5 ml, 0,75 ml, 1ml, 1, 25 ml et 1.5ml sont pris et complétés jusqu'à 20 ml par le milieu PDA ; la gamme des concentrations finales ainsi obtenues correspond à 0.25mg/ml, 0,375mg/ml– -0,5mg/ml - 0,625mg/ml et 0.75mg/ml.

IV.5.4 Extraction des flavonoïdes

Macérer 30 g de poudre végétale dans 100 ml de méthanol pendant 72 h. Après filtration, le méthanol a été évaporé sous vide à une température de 60°C à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le résidu sec obtenu a été traité avec 50 ml d'eau tiède pour obtenir un extrait aqueux. Nous avons effectué une série d'extractions liquide-liquide dans une ampoule à décanter.

Cette opération permet la séparation d'un ou plusieurs composants en exploitant leur répartition inégale dans deux liquides non miscibles. Il consiste à ajouter 3x30ml de chloroforme, qui élimine la chlorophylle et les lipides. Après, nous avons ajouté 3x30 ml d'éther diéthylique pour extraire les génines et les flavonoïdes. Ajouter enfin 3x30 ml d'acétate d'éthyle pour éliminer les monosides et entraîner la majeure partie des hétérosides flavoniques. Au cours de ces différentes étapes nous récupérons la phase aqueuse. Dans la dernière phase aqueuse on ajoute 3x30 ml de butanol pour récupérer la phase alcoolique. Cette dernière phase contenant les flavonoïdes a été récupérée dans un ballon préalablement pesé. Le butanol a ensuite été évaporé sous vide à 55°C pour obtenir un résidu sec. C'est l'extrait des flavonoïdes qui sera pesé (**Feknous et al., 2014**).

IV.5.5 Extraction des alcaloïdes totaux

L'extraction des alcaloïdes totaux est obtenue en utilisant la méthode d'extraction liquide-liquide, basant sur la solubilité différente des alcaloïdes dans les milieux acides et alcalins (**Bruneton, 1999**).

Broyez finement 100 g de plantes séchées avec un broyeur électrique. La poudre obtenue est dégraissée avec 250 ml d'éther de pétrole par macération et agitation mécanique à température ambiante pendant 24 heures.

Après filtration, le marc (graines dégraissées broyées) est alcalinisé avec 40 ml d'ammoniaque (0,5N) à température ambiante pendant au moins 8 heures pour transformer les alcaloïdes de leur forme saline en organique. Mettre la poudre alcalinisée dans une cartouche de cellulose, qui est ensuite placée dans un extracteur Soxhlet. Ce dernier a été monté sur un ballon contenant 250 mL de dichlorométhane. Les alcaloïdes de la première étape sont extraits par chauffage avec 250 ml de chlorure de méthylène à reflux pendant 3 à 4 heures (il faut au moins 5 cycles pour épuiser complètement les graines). A l'issue de cette opération, l'extrait brut a été purifié par trois extractions consécutives avec 150 ml d'une solution d'acide sulfurique (0,5N) en plaçant les trois fractions dans une ampoule à décanter, alcalinisées à pH 9 en ajoutant quelques ml d'ammoniac (0,5N).

Nous épuisons ensuite trois fois la solution par 150 ml de chloroforme, en agitant doucement l'ampoule à chaque fois. Nous récupérons les trois fractions organiques dans un erlen Mayer, qui seront déshydratées par filtration sur papier filtre soutenant du sulfate de sodium anhydre. L'extrait recueilli dans un bêcher taré est évaporé à sec sur plaque chauffante. Après refroidissement, nous pesons à nouveau le bêcher. Le résidu sec représente les alcaloïdes totaux

IV.5.6 Fractionnement des extraits brut

Les extraits bruts aqueux macérés d'*E. alata* et *A. halimu* sont été fractionnée selon la méthode de **Markham (1982)** modifié par **Boumarfag (2006)**, en utilisant une série de solvants à polarité croissante (Figure IV.4). L'extrait brut est initialement mélangé avec l'hexane (1 V/V) et la phase organique supérieure a été récupérée après décantation. Cette étape est refaite plusieurs fois avec renouvellement du solvant jusqu'à ce qu'il devienne transparent. L'hexane est par la suite évaporé et l'extrait résultant est considéré comme étant la fraction de l'hexane (Hx).

La phase aqueuse inférieure a ensuite été fractionnée avec du chloroforme pour obtenir la fraction chloroforme (Ch), et enfin fractionnée avec de l'acétate d'éthyle pour obtenir la fraction d'acétate d'éthyle (Ac), la procédure était la même que pour le premier fractionnement à l'hexane. Le raffinat résultant représente la fraction aqueuse (Aq).

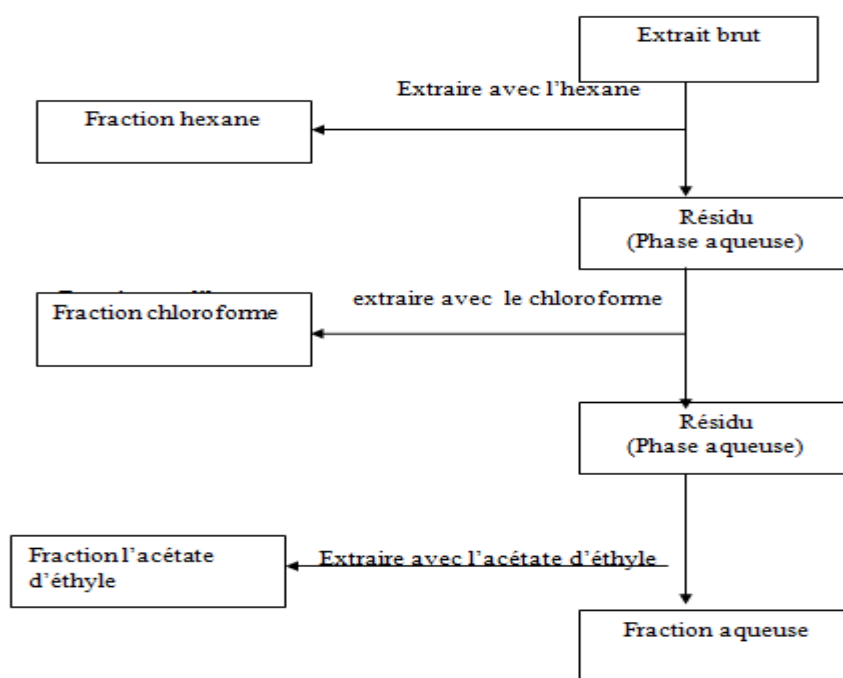


Figure IV.4: Les étapes du fractionnement des extraits aqueux d'*E.alata* et *A.halimus* (Markham, 1982).

IV.6 Activités biologiques des extraits et fractions d'*E.alata* et *A.halimus*

IV.6.1 Activité antimicrobienne

IV.6.1.1 Souches testées

Notre travail consiste à étudier l'activité antimicrobienne des extraits et fractions d'*E.alata* et *A.halimus*, Les tests sont réalisés sur huit souches bactériennes de référence et trois souches fongiques (Tableau IV.1) ainsi huit souches responsable des infections nosocomiales.

IV.6.1.1.1 Souches bactériennes de référence et souches fongiques testées.

Le tableau ci-dessous (tableau IV.1) montre les souches bactériennes de référence et les souches fongiques testées dans cette étude.

Tableau IV.1 : Souches microbiennes testées et leurs origines.

Souches utilisés		provenance
Bactéries	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028; <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212; <i>Streptococcus faecalis</i> ATCC10541; <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923; <i>Bacillus cereus</i> ATCC11778; <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633; <i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090; <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.	Laboratoire de Valorisation des Ressources Végétales et Sécurité Alimentaires des Zones Semi-arides du Sud-ouest Algérien. Université de Béchar
Champignons	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Aspergillus niger</i>	

ATCC : l'American Type Culture Collection.

IV.6.1.1.2 Souches responsable des infections nosocomiales.

Les huit souches bactériennes testées dans cette étude sont prélevées de l'hôpital de Tourabi Boudjema (240 lit) à Bécher. Les souches sont prélevées de deux services différents (service pneumologie : chambre de femme n 01 et unité d'exploration, service infectieux : chambres 3 et 8) (tableau IV.2) par Millipore Kit testeur M Air T® (ATAS PLR 01). Les microorganismes testés ont été collectés à partir d'échantillons d'air intérieur directement après sortie des patients et nettoyage.

Tableau IV.2: Provenance des souches bactériennes responsable des infections nosocomiales.

Genre	Origine		nombre	pourcentage
<i>Staphylococcus aureus</i>	S1	Service infectieux (chambre 8)	04	50%
	S4			
	S2	Service infectieux (chambre 3)		
	S3	Service pneumologie (chambre de femme n 01)		
<i>Escherichia coli</i>	Service pneumologie (unité d'exploration)		01	12.5%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Service pneumologie (unité d'exploration)		01	12.5%
<i>Serratia marcescens</i>	Service infectieux (chambre 3)		01	12.5%
<i>Bacillus cereus</i>	Service infectieux (chambre 3)		01	12.5%
totale	08			100 %

IV.6.1.1.3 Vérification de la pureté des souches

a) Bactéries

La vérification des puretés des souches (Annexe 4) est basée sur :

- l'observation macroscopique des colonies (diamètre, aspect et couleur) et l'observation microscopique des bactéries (forme, mobilité et le mode de réarrangement) ;
- le test de la catalase et de l'oxydase ;
- la coloration de Gram ;
- Identification sur plaque API 20

b) Champignons

L'identification des genres de moisissures (Annexe 5) repose sur :

- des caractères culturels (macroscopiques) : couleur et texture des thalles, vitesse de croissance...;
- technique de micro culture;
- Technique de single spore.

IV.6.1.1.4 Conservation des souches

Les souches pures sont conservées à 4°C dans la gélose nutritive inclinée pour les bactéries et dans le milieu PDAac (Potatos Dextrose Agar acidifié) incliné pour les champignons.

IV.6.1.2 Activité antibactérienne

IV.6.1.2.1 Préparation d'inoculum

A partir d'une culture pure des bactéries sur milieu d'isolement (milieu gélose nutritive) ayant au maximum 24h, on racle à l'aide d'une pipette pasteur scellée quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques. Ensuite, on décharge la pipette pasteur dans 10 ml d'eau physiologique stérile et on homogénéise la suspension bactérienne ; son opacité doit être équivalente à une D.O égale à 0,08 à 0,10, lue à la longueur d'onde de 625 nm qui correspond à 10^8 UFC/ml (Gachkar et al., 2007).

IV.6.1.2.2 Antibiogramme

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage. À l'aide d'un écouvillon stérile, introduit dans la suspension bactérienne et essoré contre la paroi interne du tube, réaliser des stries parallèles et aussi serrées que possible à la surface d'une boîte de Pétri préalablement coulée avec la gélosé de Mueller- Hinton. Répéter l'opération deux fois en tournant la boîte 60° et en tournant l'écouvillon sur lui-même. Des disques d'antibiogramme sont déposés à la surface de la boîte de Pétri ensemencée à l'aide d'une pince stérile.

Les boîtes de Pétri sont laissées sur la paillasse un peu de temps pour une pré-diffusion, puis incubées à 37°C pendant 24 h. La lecture des résultats se fait par la mesure, à l'aide d'une règle graduée, du diamètre de la zone d'inhibition formée autour du disque, en prenant la moyenne des trois essais effectués (Gulluce et al., 2007).

Les antibiotiques utilisées sont: amoxicilline, amikacine, colistino, gentamicine, triméthoprim pour *Staphylococcus aureus* et amoxicilline, oxacilline, tobramycine, ofloxacine, érythromycine pour *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Serratia liquefaciens* et *Bacillus cereus*.

IV.6.1.2.3 Méthode de contacte directe

Dans des tubes à essai contenant 13,5 ml de la gélose Muller Hinton liquéfiée, on a ajouté des volumes d'extrait ou fractions de 1,5 ml. On agite jusqu'à la dispersion des extraits dans la gélose puis on coule les milieux dans les boites de Pétri. Après solidification de la gélose on ensemence les souches bactériennes.

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boites de Pétri, un écouvillon est 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.

L'opération est répétée deux fois en tournant la boite de 60° à chaque fois. L'ensemencement est fini en passant l'écouvillon une dernière fois sur toute la surface gélosée. L'écouvillon est rechargé à chaque fois qu'on ensemence plusieurs boites de Pétri avec la même souche. L'incubation a été faite à 37°C pendant 24 heures.

IV.6.1.2.4 Méthode de disque

La méthode de diffusion de disque est une technique qualitative permettant de déterminer la sensibilité des microorganismes vis-à-vis d'une substance réputée antimicrobienne. les disques sont imbibés de 20 µl de chaque extrait ou fraction (**Sokmen et al., 2004**).

Une suspension des microorganismes d'essai a été ensemencée sur le milieu d'agar Muller Hinton (MH) à l'aide d'un écouvillon, l'opération est répétée deux fois en tournant la boite de 60° à chaque fois. Les disques de papier filtre (6 mm de diamètre) ont été placés sur les boites de gélose qui ont été inoculées avec les microorganismes testés, puis imprégnées de 20µl d'extrait végétal ou fraction. Les boites ont ensuite été incubées à 37 °C pendant 24 heures. Après l'incubation, la zone d'inhibition de la croissance a été quantifiée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition en mm (Figure IV.5) (**Kumar et al., 2009**).

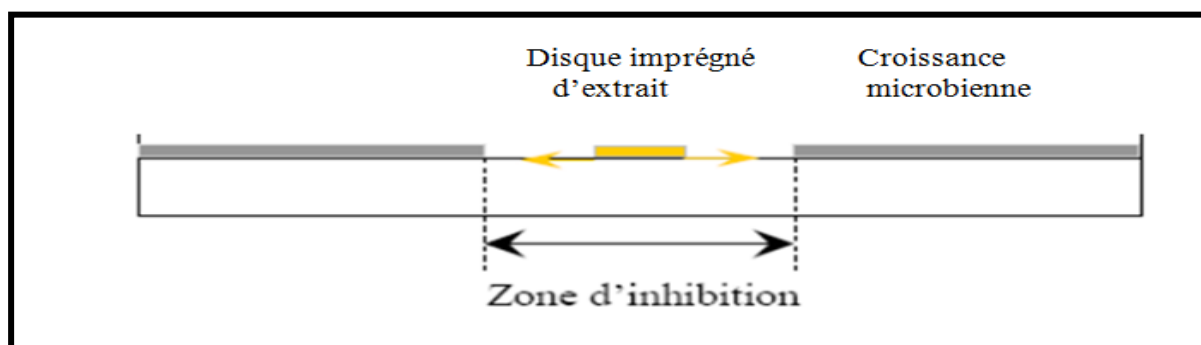


Figure IV.5 : Schéma simplifié du principe de la méthode de l'aromatogramme.

Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé d'après la sensibilité des souches vis-à-vis les extraits (**Ponce et al., 2003**).

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre ≤ 8 mm.
- Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14 mm.
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19 mm.
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre ≥ 20 mm.

IV.6.1.2.5 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide

La technique utilisée a été décrite par CLSI en 2006. Elle est basée sur la capacité des microorganismes à produire une croissance visible à l'œil nu au sein d'une série de dilutions de la substance antimicrobienne (**CLSI, 2006**).

- Préparation de la microplaque

Le milieu utilisé était Mueller Hinton (MH). Pour chaque rangée de la microplaque, nous avons placé 50 μ l de milieu de test dans 12 puits sauf N°1 et N°12. Le puits N°1 servira de puits starter ne contenant que l'extrait à tester (100 μ l) et le puits N°12 servira de puits témoin de contamination ne contenant que du milieu comme témoin positif (100 μ l). Nous avons ensuite ajouté 50 μ l de solutions mères d'extraits ou de fractions du puits N°1 au puits N°2. Après avoir mélangé le contenu du deuxième puits, on prélève 50 μ l que nous avons mis dans le troisième puits, puis du troisième au quatrième, et ainsi de suite jusqu'au dernier puits pour obtenir une dilution en série moitié-moitié. Les 50 μ l restants dans le dernier (dixième) puits doivent être jetés. Enfin, nous avons introduit 50 μ l de l'inoculum dans chaque puits de 2 à 11. Le puits N°11 servira de contrôle positif (croissance sans extrait) (Figure IV.6).

Les plaques sont scellées avec un aluminium stérile et placées dans une étuve à 37°C pendant 24 heures. Les résultats sont lus visuellement à l'aide d'une source lumineuse sous la microplaque pour voir si une inhibition (la croissance sous forme une trouble) est présente. La plus faible concentration de chaque fraction ne montrant aucune croissance sera considérée comme la concentration minimale inhibitrice (CMI).

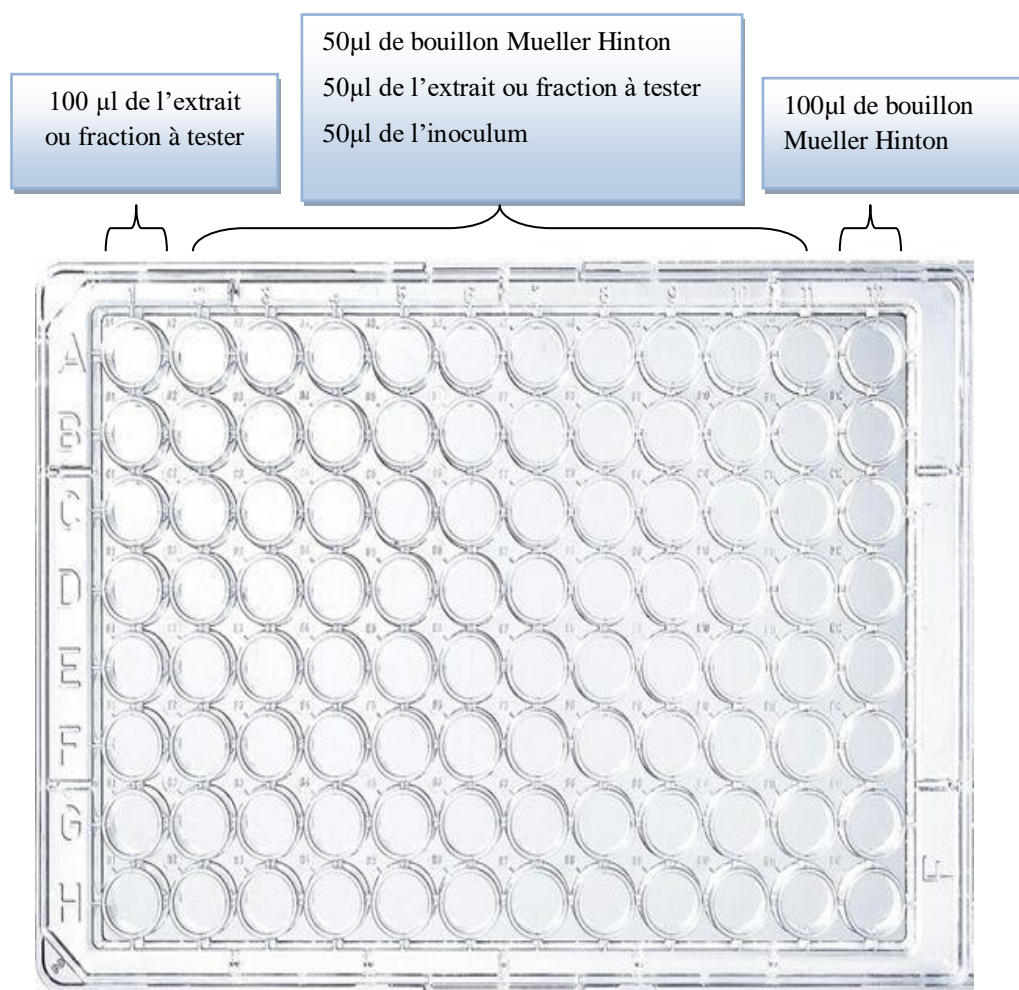


Figure IV.6 : Schéma d'utilisation d'une microplaque.

IV.6.1.3 Activité antifongique

L'activité antifongique des extraits d'*E.alata* et *A.halimus* a été testée par la technique de croissance radiale sur milieu solide.

IV.6.1.3.1 Préparation de l'inoculum

A l'aide d'une pipette Pasteur, placer les spores d'une culture de 7 jours dans une suspension semi-solide à base de 0,2% d'agar et 0,05 Tween 80, et agiter vigoureusement le mélange à l'aide d'un vortex pour suspendre le contenu des spores

IV.6.1.3.2 Principe

La technique consiste à placer 1,5 de chaque extrait ou fraction dans des tubes à essai et à les compléter avec 20 ml de milieu PDAA pour évaluer leur pouvoir antifongique. Après avoir agité le tube avec un vortex, verser son contenu dans des boîtes de pétri (Hibar et al., 2006).

À l'aide d'une anse de platine une goutte de la suspension sporale préparée est déposée au centre de chaque boîte. Notons que des boîtes témoins sont aussi préparées. L'ensemble des boîtes est incubé à $(25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C})$.

La croissance mycélienne radiale est mesurée à partir de 3^{ème} jours d'incubation et juste avant que les filaments mycéliens atteignent la périphérie des boîtes témoins (**Soro et al., 2010; Kra et al., 2009**). Le principe de cette méthode est illustré dans la figure IV.7.

IV.6.1.3.3 Expression des résultats

Le pourcentage d'inhibition de la croissance (PIc) dû à chaque extrait ou fraction est évalué par rapport à la croissance mycélienne dans les boîtes témoins selon la formule suivante (**Singh et al., 2009**):

$$PIc = \frac{DT - D}{DT} \times 100$$

Où :

DT : Diamètre moyen de la croissance mycélienne sur le milieu témoin.

D : Diamètre moyen de la croissance mycélienne en présence d'extrait à tester.

L'extrait est dit :

- Très actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 75 et 100 %, la souche fongique est dite très sensible ;
- Actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 50 et 75 %, la souche fongique est dite sensible ;
- Moyennement actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 25 et 50%, la souche est dite limite ;
- Peu ou pas actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 0 et 25%, la souche est dite peu sensible ou résistante (**Bougandoura, 2012**)

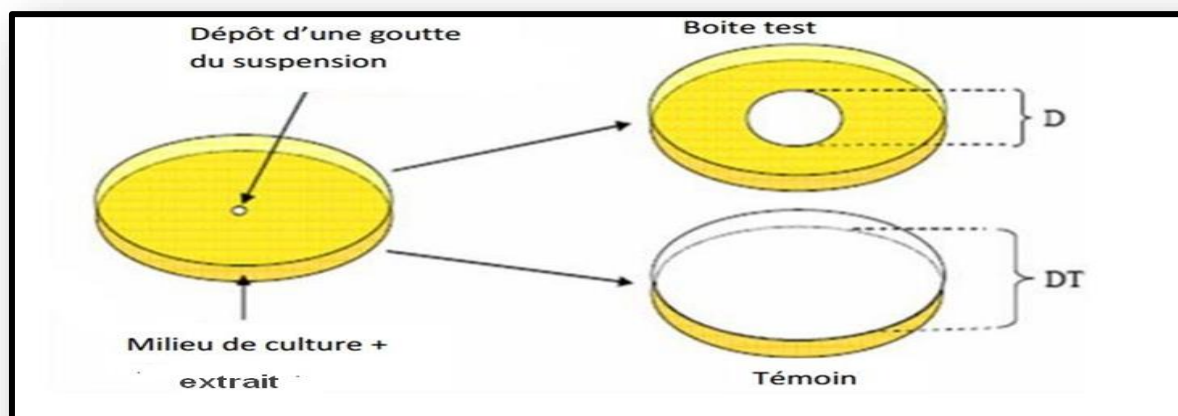


Figure IV.7 : Principe d'évaluation d'activité antifongique par la méthode de croissance radiale (Muhizi, 2008).

IV.6.2 Activité antioxydante

IV.6.2.1 pouvoir antioxydant par test de DPPH

Avant d'effectuer des tests antioxydants sur nos extraits en mesurant l'absorbance, il est préférable de confirmer la capacité antioxydante de nos échantillons par des tests qualitatifs.

➤ **Protocol**

.Après la préparation de l'extrait méthanolique, aqueux et d'acétate d'éthyle ces dernier sont soumis à une préparation par chromatographie sur couche mince en utilisant du méthanol/ chloroforme (10 :90) comme éluant. Après avoir déposé nos extraits sur la plaque, cette dernière est développée dans une chambre chromatographie. Après avoir séché les plaques à l'air libre pendant 15 min, exposer les plaques à un spray de solution de méthanol DPPH à 0,004 % (m/v). Observez la coloration des spots après séchage des plaques dans une étuve à 60 ° C pendant 30 min. L'apparition de jaune indique un test positif.

IV.6.2.1.1 Préparation de l'extrait à tester

Dissoudre 2 mg du résidu de la plante, alcaloïdes, flavonoïdes ou fractions dans 2 ml de méthanol (solution mère mg/ml). Préparer différentes concentrations de l'extrait (0.5 ; 0.25 ; 0.125 ; 0.0625 ; 0.0312 ; 0.0156)

IV.6.2.1.2 Préparation de la solution de DPPH dans le méthanol

Dissoudre (1 mg) de DPPH dans 25 ml de méthanol qui serve comme solution stock. Protéger la solution de la lumière en recouvrant le tube avec papier aluminium. Le mélange est conservé dans le frigo à -4°C à l'obscurité. Il faut utiliser cette solution dans un intervalle de 1 à 4 jours.

➤ **Protocole du pouvoir antioxydant :**

Ajouter 1.9 ml de la solution méthanolique de DPPH (0.004%) à 100 µl de l'échantillon dissout dans le méthanol à différentes concentration. Après 30 min de réaction, l'absorbance est mesurée à 517 nm. Refaire l'essai trois fois. De même, l'activité antioxydante a été mesurée pour le control positif « acide ascorbique » aux mêmes concentrations décrites ci-dessus.

$$\% \text{ RSA} = (\text{Abs contrôle} - \text{AbsE}) / \text{ABS contrôle} \times 100\%$$

Avec :

Abs contrôle : absorbance de DPPH

Abs E : absorbance de l'échantillon

RSA : Pourcentage d'inhibition

IV.6.2.2 Méthode de FRAP (réduction de fer)

Cette méthode est déterminée en utilisant la technique d'Oyaizu (1986). Les différentes concentrations des extraits ou fraction [200-1000 µg/ml] dans l'eau distillée (1 ml) sont mélangées avec 2.5 ml de la solution tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) et 2.5 ml de ferricyanure de potassium [K₃Fe(CN)₆] (1%). Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 20 min. Après, 2.5 ml de l'acide trichloracétique (10%) est additionné. Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10 min. A la fin, 2.5 ml du surnageant de chaque concentration est mélangé avec 2.5 ml de l'eau distillée et 0.5 ml de FeCl₃6H₂O (0.1%). L'absorbance est mesurée à 700 nm.

L'augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel indique l'augmentation de la réduction de fer. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif. La concentration CI50 qui est définie comme la concentration des antioxydants nécessaire pour réduire 50% de la concentration initiale du thiocyanate ferrique est un indice utilisé pour comparer et exprimer la puissance des capacités réductrices des substances bioactives.

IV.6.3 Evaluation in vitro de l'activité antidiabétique

Les différents extraits ou fractions de deux plantes *E.alata* et *A.halimus* ont été évalués pour leur activité antidiabétique in vitro par les tests d'inhibition enzymatique α -amylase et α -glucosidase à une concentration de 10 mg/ml. L'acarbose «LARIMEL®50» est un antidiabétique utilisé comme contrôle positif

6.3.1 Test α -amylase

Nous avons utilisé l'enzyme α -amylase d'origine porcine E.C.3.2.1.1 (de Sigma-Aldrich Chemical, A3176) sous forme lyophilisée, avec un poids moléculaire de 13000 Da et une activité spécifique de 13 UI/mg. Le substrat est l'amidon de pomme de terre soluble et les produits sont : les oligosaccharides, dextrines et maltose (Worthington, 1988).

- **Principe**

Nous avons testé l'effet inhibiteur des extraits et fractions d'*E.alata* et *A.halimus* sur l'activité α -amylase selon le protocole de Thalapaneni et al. (2008).

- **Mode opératoire**

1- Préparation de le réactif chromogène 3,5-dinitrosalicylique (DNSA) par mélange de deux solution : solution 1 (1 g de l'acide 3,5-dinitrosalicylique a été solubilisé dans 40 ml d'eau distillée et solution 2 (NaOH (2N) dans 20 ml d'eau distillée dans laquelle dissoudre 30 g de tartrate double de sodium de potassium sous agitation) puis nous avons mélangé les deux solutions sous agitation et nous avons ajusté le volume final à 100 ml avec l'eau distillée ;le réactif a été conservé à l'abri de la lumière à 4°C.

2-Préparation de la solution α -amylase (1 mg d'enzyme α -amylase porcine dans 13 ml d'une solution tampon phosphate (20mM, pH 6,9)).

3-Préparation de la solution d'acarbose commercialisé à différentes concentrations (20-300 μ g/ml) dans le tampon phosphate (20 mM, pH 6,9) .

4-Préparation de la solution de substrat par solubilisation de 1g d'amidon soluble de pomme de terre dans 100 ml de la solution tampon phosphate (20 mM, pH 6,9).

5-Préparation d'une gamme de dilution des différents extraits et fractions (25-300 μ g/ml) dans la solution tampon phosphate (20 mM, pH 6,9).

Puis nous avons ajouté 200 µl de la solution enzymatique sur 200 µl de chaque dilution d'extrait, fraction ou acarbose le mélange a été incubé 10 min à 37 °C puis on ajoute 200 µl d'amidon 0,5% après nous avons incubé le mélange à 37 °C pendant 15 min après nous avons ajouté 400 µl du réactif du DNSA et nous avons placé le mélange à l'ébullition pendant 5 min, après refroidissement dans un bain d'eau glacé, nous avons lu les absorbances à 540 nm, enfin, nous avons préparé un contrôle négatif dans les mêmes conditions opératoires : 200 µl de la solution enzymatique α -amylase + 200 µl de solution tampon + 200 µl d'amidon (tableau IV.3).

Tableau IV.3: Protocol test α -amylase

	Acarbose [20-300 µg/ml]	Extrait ou fraction [25-300 µg/ml]	Blanc	Contrôle négatif	Blanc
Dilution µl	200	200	200	-	-
Enzyme α - amylase µl	200	200	-	200	-
Solution tampon pH 6.9 µl	-	.	200	200	400
Incubation pendant 10min à 37°C					
Amidon soluble 0,5% µl	200	200	200	200	200
Incubation pendant 15min à 37°C					
Réactif DNSA µl	400	400	400	400	400
Bain marie 100 °C pendant 5min					
Bain d'eau glacé					
Lecture à 540 nm					

- **Expression des résultats**

. L'activité des extraits et fractions des deux plantes sur l'alpha-amylase est déterminée par la formule: $I (\%) = [(A \text{ contrôle négatif} - A \text{ extrait}) / A \text{ contrôle négatif}] \times 100$ (A : absorbance) (Mahdi, 2021).

6.3.2 Test α -glucosidase

Nous avons utilisé l'enzyme α -glucosidase de la levure *Saccharomyces cerevisiae* EC 3.2.1.20 (1 U/ml) auprès Sigma-Aldrich Chemical, A5003. Le substrat est le PNPG (4-nitrophényl- α -D-glucopyranoside) et le produit est le glucose.

- **Principe**

Le test d'activité inhibitrice de l' α -glucosidase a été réalisé selon la méthode de Shibano et al. (1997). Le principe consiste à mettre en contact les différents extraits et fractions d'*E.alata* et *A.halimus* avec l' α glucosidase et son substrat et mesurer l'intensité de l'absorbance à 405 nm afin d'évaluer le degré d'inhibition de l'activité enzymatique par les échantillons étudiés.

- **Mode opératoire**

50 μ L de tampon phosphaté (50 Mm, Ph 6,8), 20 μ l de chaque concentration d'extrait, fraction ou Acarbose et 10 μ l de la solution enzymatique α -Glucosidase (1 mg d'enzyme dans 1 ml de la solution tampon phosphate (50 mm, ph 6,8)) ont été ajoutés à chaque puits d'une Microplaque, le mélange à été incubé à 37 °C pendant 10 min; Puis nous avons ajouté 20 μ l de PNPG (10 mm) et incubé de nouveau à 37 °C pendant 30 min ; nous avons stoppé la réaction par l'ajout de 100 μ l de Na₂CO₃ (0,2 M).

Les absorbances ont été lu à l'aide d'un lecteur microplaque à 405 nm.

En fin, nous avons préparé un contrôle négatif dans les mêmes conditions expérimentales: 10 μ l de la solution enzymatique α -glucosidase + 70 μ l de solution tampon + 10 μ l PNPG (tableau IV.4).

Tableau IV.4: Protocol test α -glucosidase

	Acarbose [20-300 $\mu\text{g/ml}$]	Extrait ou fraction [25- 500 $\mu\text{g/ml}$]	Blanc	Contrôle négatif	Blanc
Dilution μl	20	20	20	-	-
Enzyme μl	10	10	-	10	-
Tampon (50 mM, pH 6,8) μl	50	50	60	70	80
Incubation pendant 10min à 37°C					
PNPG (10 mM) μl	20	20	20	20	20
Incubation pendant 30 min à 37°C					
Lecture à 405 nm					

- **Expression des résultats**

Le pourcentage d'inhibition de l' α -glucosidase a été déterminé selon la formule suivante: $I(\%) = [(A \text{ contrôle négatif} - A \text{ échantillon}) / A \text{ contrôle négatif}] \times 100$ (A : absorbance). Les valeurs de CI50 ont été déterminées comme les concentrations d'extrait ou fraction qui inhibent 50% de l'activité α -glucosidase (**Mahdi, 2021**).

Résultats et discussions

Pendant des siècles, l'homme s'est toujours soigné par les plantes, de manière empirique, guidé par la tradition ou les coutumes. Les vertus thérapeutiques de ces plantes ont été expérimentées depuis lors et leurs précieuses caractéristiques se sont transmises oralement de génération en génération ou consignés dans les vieux écrits.

Actuellement, les plantes aromatiques possèdent un atout considérable grâce à la découverte progressive des applications des leurs métabolites secondaires dans les soins de santé ainsi que leurs utilisations dans d'autres domaines d'intérêt économique. Pour cela, leur utilisation devrait être basée sur les connaissances fiables et suffisantes apportées par la recherche scientifique bien menée.

V.1 Etude ethnobotanique

V.1.1 Informations générales sur les personnes enquêtées

Tenant compte de notre analyse, il a été constaté que sur l'effectif de 500 personnes, on a 228 femmes et 272 hommes, soit 54,4 % de sexe masculin.

Partant de l'âge des enquêtés, 87 personnes soit 17,4% ont l'âge inférieur de 20 ans ; 159 personnes soit 31,8% ont l'âge qui varie entre 20 à 40 ans ; 141 personnes soit 28,2% ont l'âge qui varie entre 40 à 60 ans ; 113 personnes soit 22,6% ont l'âge supérieur de 60 ans. On constate que ceux dont l'âge varie entre 20 et 40 ont constitué la grande partie de notre enquêtés.

En ce qui concerne le niveau d'étude, 97 personnes sur 500 enquêtés soit 19,4% n'ont aucun niveau d'étude ; 34 personnes soit 6,8% sont du niveau primaire ; 240 personnes soit 48% ont le niveau secondaire ; 129 personnes soit 25,8% ont un niveau universitaire; On constate que le niveau secondaire est répondu plus que tous les autres niveaux

V.1.2 Résultat de l'enquête

V.1.2.1 Connaissance des deux plantes

Pour l'*Ephedra* et selon les résultats de l'enquête ethnobotanique (figure V.4), l'importance de la plante semble être ignorée par la population, dont 46,6 % ignorent totalement la plante et 24,6 % même s'ils connaissent le nom de la plante, ils n'ont aucune idée de son utilisation en médecine traditionnelle.

La minorité des personnes qui connaissent l'une ou plusieurs des utilisations médicinales de la plante présentent une moyenne d'âge de 56,7 ans. Benkhigui et al., (2011) ont noté effectivement que les personnes les plus âgées ont plus de connaissances sur les plantes médicinales par rapport aux autres classes d'âges. Aussi, dans l'étude de

Hammoudi (2015), les personnes âgées de 41-60 ans sont celles qui utilisent le plus les plantes.

Concernant l'*Atriplex* la plante est plus connue par la population ou on a seulement 15,2% des enquêtés qui ignorent totalement la plante, contre 75,8% qui connaissent au moins une ou plusieurs des utilisations de la plante et 9% qui connaissent le nom de la plante mais ils n'ont aucune idée de son utilisation.

Le faible intérêt pour les effets thérapeutiques des plantes, marqué chez les jeunes s'explique par leur méfiance et leur tendance à ne plus trop croire en cette médecine traditionnelle (Mehdioui et Kahouadji, 2007).

L'utilisation de ces deux plantes varie selon le sexe. Les femmes les utilisent beaucoup que les hommes.

Un autre constat, la grande majorité des enquêtés analphabètes et les enquêtés ayant le niveau de l'école primaire connaissent les deux plantes et ou moins une de leur utilisation. Ce résultat est en effet obtenu au niveau d'autres études ethnobotaniques prouvant que le savoir populaire est détenu actuellement par peu de personnes parmi lesquelles on trouve un taux d'analphabétisme élevé (Lahsissene et al., 2009).

V.1.2.2 L'origine de l'information

52 % des enquêtés qui connaissent l'une ou les deux plantes se réfèrent aux expériences des autres, pour les utiliser comme remèdes contre des maladies. Ceci reflète l'image de la transmission relative des pratiques traditionnelles d'une génération à l'autre. 37% des enquêtés se réfèrent aux herboristes et 11 % des personnes se réfèrent à eux-mêmes soit en consultant les livres de la médecine traditionnelle soit en suivant les programmes télévisés ou bien en utilisant l'internet.

V.1.2.3 L'utilisation thérapeutique des deux plantes

La plupart des enquêtés sont en accord par rapport à l'utilisation de *Ephedra*, et surtout dans le cas des problèmes de l'appareil respiratoire.

Ephedra est utilisée en Chine pour soulager les rhumes, la fièvre, la toux et une respiration sifflante. Elle est également consommée sous forme de poudre afin de traiter les déficiences des reins. En occident, l'éphédra est utilisée en décoction pour soulager les rhumatismes, l'asthme, le rhume des foins, soigner la grippe, pour augmenter la pression artérielle et pour initier les menstruations (Chevallier, 1996).

Elle est enfin utilisée sous forme d'onguent pour soulager des rhumatismes et d'autres douleurs diverses. On l'utilise aussi en association avec la *Lobelia inflata* contre

l'asthme; avec *Echinacea purpurea* contre la fièvre. Au Maroc, l'*E.alata* est utilisée pour lutter contre le diabète (Ghourri et al., 2013).

En Egypte, *E.alata* est utilisée en médecine traditionnelle comme dépurative, antiasthmatique et agent astringent (Nawwar et al., 1984). Selon l'enquête ethnobotanique de Ould El Hadj et al. (2003) en Algérie, *E. alata* s'utilise contre la grippe, la coqueluche et la faiblesse.

Nous avons regroupé dans la figure V.1 quelques applications de cette plante en fonction du taux d'utilisation, selon notre enquête.

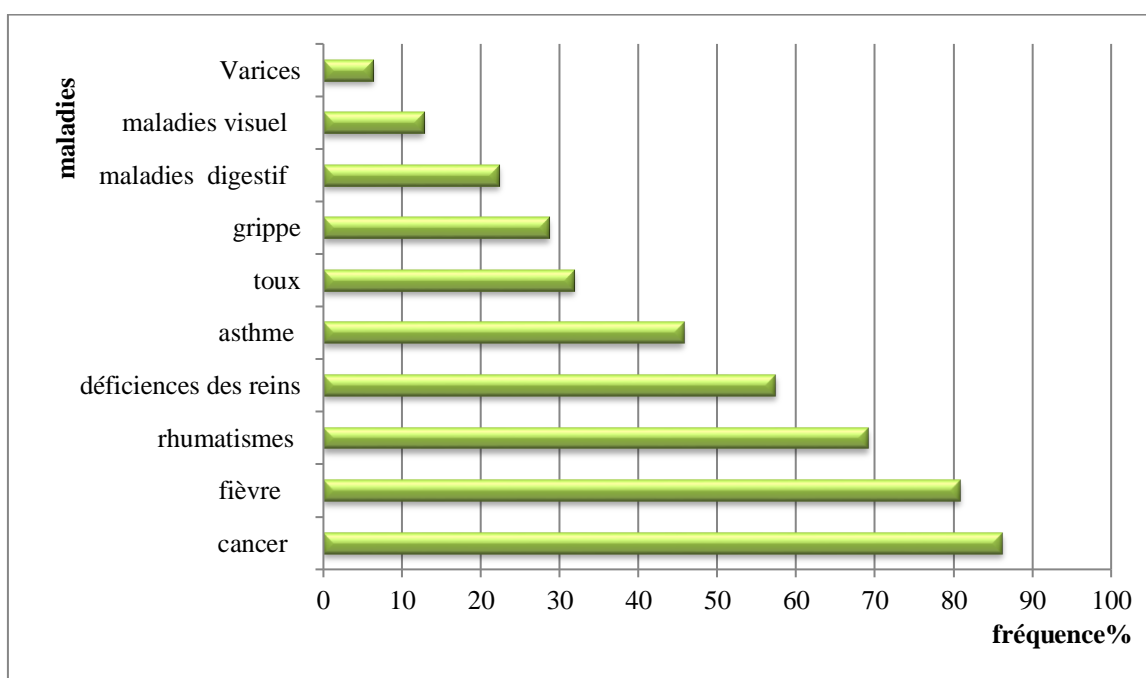


Figure V.1: Fréquences de différentes utilisations de l'*E.alata*.

La grande partie de nos enquêtés ont été en accord de l'efficacité d'*A.halimus* dans le traitement des kystes ovariens (figure V.2).

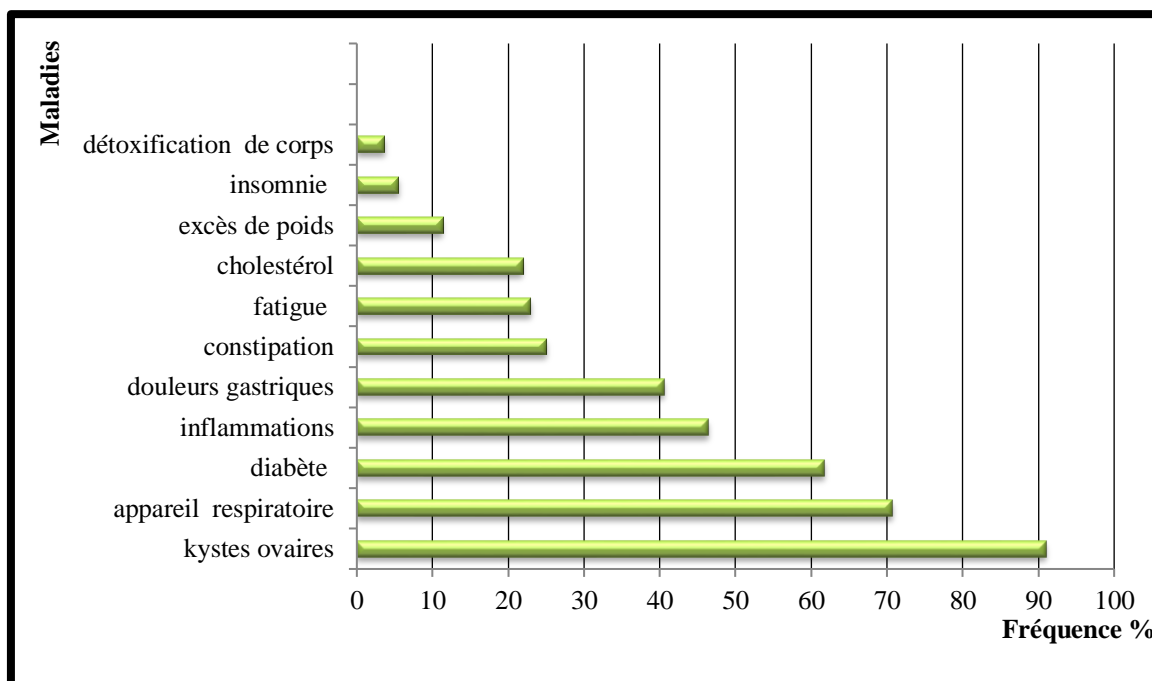


Figure V.2 : Fréquences de différentes utilisations d'*A. halimus*.

Selon nos enquêtés, *l'A. halimus* est utilisée pour traiter les inflammations, la fatigue, le diabète et les kystes oviaires.

Elle est également connue comme un traitement populaire pour les maladies de l'appareil respiratoire, les douleurs gastriques, la constipation et l'excès de poids. Elle aide à détoxifier le corps, à traiter les problèmes d'insomnie et à réduire le taux de mauvais cholestérol dans le sang.

V.1.2.4 Partie utilisée

Diverses parties de la plante (écorces, racine, tige, feuilles, fruits, graines, rameaux feuillés et tubercules) sont utilisées pour les préparations médicamenteuses.

Pour *E. alata* tous nos enquêtés sont été en accord que la partie aérienne constituée des tiges et des minuscules feuilles est la partie le plus utilisé.

Pour *l'A. halimus* les feuilles (83,27 %) sont majoritairement sollicitées. Ce résultat est proche à celui de **Zirihi (1991)** qui a montré que les feuilles étaient majoritairement employées dans 64,49 % des cas d'utilisation des plantes médicinales.

V.1.2.5 Mode de préparation

Afin de faciliter l'administration du principe actif, plusieurs modes de préparations sont employés à savoir la décoction, l'infusion, la fumigation, le cataplasme et la macération.

Pour *Ephedra alata*, Le décocté (72,97%) a été la forme médicamenteuse la plus utilisée, suivie de poudre 16,24 % (La plantes est séchée et broyées pour obtenir une poudre à avaler avec l'eau), la Fumigation (6,37 %) et le cataplasme (4,42 %)

Pour *A.halimus*, le décocté (44,12%) a été ainsi la forme la plus utilisée, suivie par l'infusion (31,09 %), de poudre (13,28 %), le cataplasme (8,24 %) et la fumigation (3,27%) (Figure V.3).

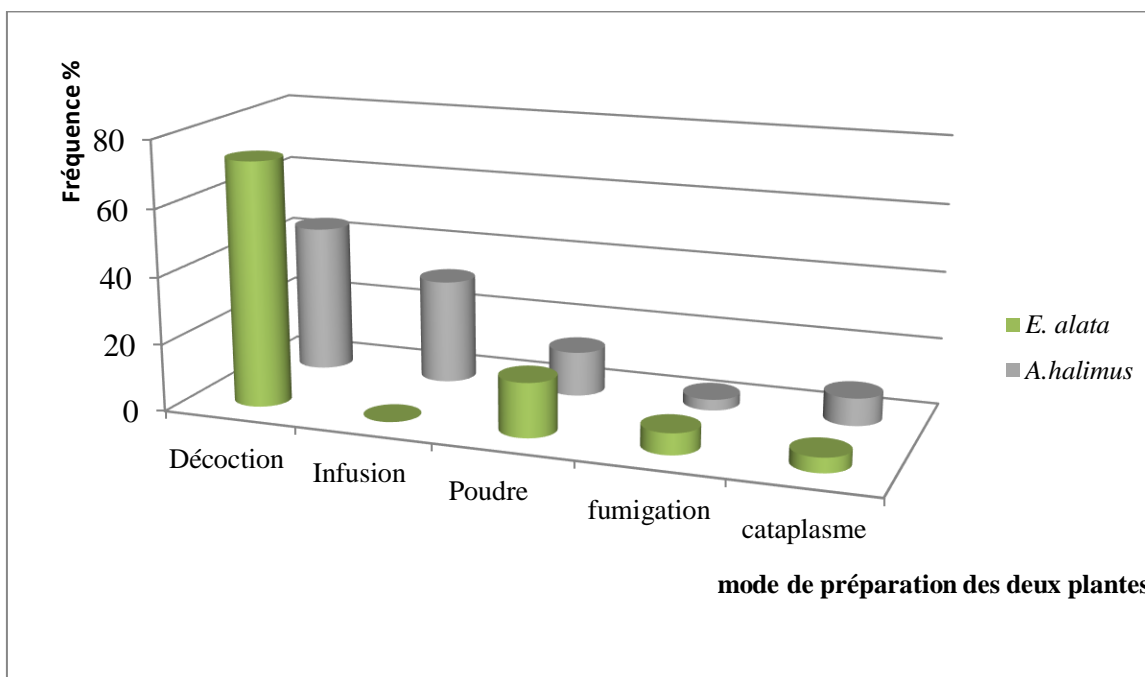


Figure V.3 : mode de préparation des deux plantes.

V.1.2.6 Dose utilisée

95,58 % des enquêtées utilisent les deux plantes avec des doses non précises, dont 8,8 % par pincée, 26,20 % par cuillerée et 50,12 % par poignée. La dose reste encore aléatoire ce qui se manifeste par des effets néfastes sur la santé. Alors que 4,42 % de la population utilisent les plantes médicinales avec des doses bien précises.

V.2 Tests phytochimiques

Les tests photochimiques consistent à détecter les différentes familles de composés existantes dans la partie étudiée de la plante par les réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composé.

Les résultats des tests phytochimiques effectués sur *E.alata* et *A.halimus* épuisés par l'eau, l'éther de pétrole et méthanol ont été regroupés dans le tableau V.1, il nous a permis de mettre en exergue ce qui suit :

Nous avons constaté l'absence des anthocyanosides, les emodols, les coumarines et les anthracénosides pour les deux plantes. Alors qu'il y a présence des flavonoïdes, ces flavonoïdes jouent des rôles très importants dans les plantes, dont elles protègent contre le stress hydrique et génère une tolérance des plantes aux métaux lourds présente dans les sols.

Hors la plante, les flavonoïdes possèdent plusieurs effets pharmacologiques. Ils sont les promoteurs dans les traitements des troubles veineux et capillaires et les agents responsables de la protection vasculaire. Ils protègent les aliments d'origine végétale de l'oxydation, ce sont ainsi des antioxydants réputés pour leur action anti radicaire (**vierling, 2008**).

Nous avons noté aussi la présence des tanins. Selon Iserin (2001), les tanins permettent de stopper les hémorragies et de lutter contre les infections. Ces tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation des lipides. En parallèle, les terpènes participent dans la protection contre les agressions des champignons (**Cavin, 1999**).

Les deux plantes contiennent les saponosides, ces molécules ont des propriétés analgésiques, anti-inflammatoires et anti-œdémateuse et contiennent également les stéroïdes qui ont une action sur les reins par amélioration du débit sanguin (**Roux et al (2007)**).

Les deux plantes contiennent également les alcaloïdes qui ont des effets thérapeutiques nombreux, certains sont employés en médecine pour leurs propriétés analgésiques (comme la morphine), anesthésiques (atropine), ou comme agents anticancéreux (taxol, vinblastine). Ils ont aussi une activité neuropharmacologique, activité cytotoxique, activité antioxydante bien que beaucoup d'entre eux soient toxiques (comme la strychnine ou l'aconitine).

Le screening phytochimique montre qu'*A.halimus* contient des quinone qui ont une activité antibactérienne et fongicide, L'effet toxique de certaines d'entre elles est notable, et pourrait engendrer un rapport bénéfice/risque défavorable (**Adiko et al., 2013**).

La plante contient également des terpénoides et stéroïdes réputés être doués de propriétés laxatives. Ces résultats sont en accord avec les tests phytochimiques de Chikhi Ilyas, 2014 qui a travaillé sur *A.halimus* de la région de Beni Ounif.

E. alata contient également des composés réducteurs qui peut être le raison de son effet antioxydant élevé (**Celiktas et al., 2007, Mierlici,2009**). Ainsi des triterpènes qui sont fréquemment rencontrés dans la nature sous une forme glycosidée dite saponine et

responsables d'une multitude d'activités thérapeutiques et biologiques (cytostatique, antivirale, insecticide, antiinflammatoire, molluscicide, analgésique) (Bruneton,1999).

E.alata contient ainsi des Polyuronides (polysaccharides), qui ont des propriétés immunomodulatrices et immunostimulantes, des activités anti-tumorales et antivirales (Delattre, 2005). Ces résultats ont été conformes à ceux de Kessal et Bouafia (2003) sur la même espèce de la région d'Ouargla. L'abondance en principes actifs confère aux deux plantes des propriétés pharmacologiques remarquables (Konkon et al., 2006).

Tableau V.1 : criblage phytochimique des deux plantes : *A.halimus* et *E.alata*.

Phytoconstituants	<i>A.halimus</i>	<i>E.alata</i>
Alcaloïde	+	+
Emodols	-	-
Coumarine	-	-
Stérols	+	-
Stéroïdes	+	+
Triterpènes	-	+
Terpénoïde	+	-
Quinon libre	+	-
Composés réducteur	-	+
Flavonoïdes	+	+
Anthracénosides	-	-
Polyuronides (polysaccharides)	-	+
Anthocyanosides	-	-
Tanins	+	+
Saponoside	+ (une mousse persistante supérieur de 1)	+

(-)Absence, (+) Présence.

V.3 Rendements des extractions

La préparation des extraits à partir des deux plantes a été effectuée par des solvants à polarité différentes il s'agit de l'eau distillée, le méthanol et l'acétate d'éthyle puis extraction des alcaloïdes, flavonoïdes et fractions des extraits aqueux.

Cette extraction a permis d'obtenir les extraits suivants pour chaque plante : L'extrait aqueux (AqM) avec macération, extrait aqueux (AqR) obtenu avec un montage sous reflux, l'extrait méthanolique (MetOH) sous reflux, l'extrait d'acétate d'éthyle (ACE) sous reflux, l'extrait des flavonoïdes (Fl), l'extrait des alcaloïdes (ALC), la fraction hexane (Hx), la fraction chloroforme (Ch), la fraction acétate d'éthyle (Ac) et la fraction aqueuse (Aq). Les extraits obtenus ont été de couleur et d'aspect différents (Tableau V.2).

Tableau V.2 : Couleur et aspect de différents extraits et fractions d'*A.halimus* et *E.alata*.

	AqM	AqR	MetOH	ACE	ALC	FL	Hx	Ch	AC	Aq
<i>A.halimus</i>	Marron	Marron	Marron foncée	Marron foncée	brun jaunâtre	Marron	Marron foncée	Marron foncée	Marron foncée	Marron
	Poudre	Poudre	Pâteux	Pâteux	Poudre	Poudre	Pâteux	Pâteux	Pâteux	Poudre
<i>E.alata</i>	Vert	Vert	Vert foncée	Vert	Vert	Vert	Vert foncée	Vert	Vert foncée	Vert
	Poudre	Poudre	Poudre	Poudre	Cristallisé	Poudre	Pâteux	Pâteux	Pâteux	Poudre

AqM : L'extrait aqueux avec macération, AqR : extrait aqueux obtenu avec un montage sous reflux, MetOH : l'extrait méthanolique sous reflux, ACE : l'extrait d'acétate d'éthyle sous reflux, Fl : l'extrait des flavonoïdes, ALC : l'extrait des alcaloïdes, Hx : la fraction hexane, Ch : la fraction chloroforme, Ac : la fraction acétate d'éthyle et Aq : la fraction aqueuse.

Le rendement est exprimé en pourcentage de masse d'extrait sec par rapport à la masse de la plante.

Les résultats obtenus ont montré que les rendements des extraits aqueux obtenus par un montage à reflux est légèrement supérieur à celui des extraits aqueux obtenus par macération et que les rendements des extraits aqueux et supérieur à celui des extraits méthanoliques (tableau V.3) pour les deux plantes. Les extraits et fractions ont donné des rendements variables allant de 0,49 % (fraction hexane) à 9,94% (extrait aqueux obtenus par un montage à reflux) pour *A. halimus* et de 0,69 % (fraction hexane) à 16,08 % pour *E.alata* (extrait aqueux macéré).

D'autre part, les rendements d'*E.alata* ont été supérieurs à celui des rendements d'*A.halimus*.

Tableau V.3 : Rendements des extraits et fraction d'*A.halimus* et *E.alata* (%).

	AqM	AqR	MetOH	ACE	ALC	FL	Hx	Ch	AC	Aq
<i>A.halimus</i>	6,57	9,94	5,91	4,74	0,94	1,42	0,49	1,12	2,87	3,01
<i>E.alata</i>	16,08	17,27	8,24	9,14	1,01	1,81	0,69	3,41	1,09	5,37

AqM : L'extrait aqueux avec macération, AqR : extrait aqueux obtenu avec un montage sous reflux, MetOH : l'extrait méthanoliques ous reflux, ACE : l'extrait d'acétate d'éthyle sous reflux, Fl : l'extrait des flavonoïdes, ALC : l'extrait des alcaloïdes, Hx : la fraction hexane, Ch : la fraction chloroforme, Ac : la fraction acétate d'éthyle et Aq : la fraction aqueuse

D'une manière générale, les teneurs en extraits secs varient non seulement d'une plante à une autre mais également en fonction des paramètres de l'extraction solide-liquide: la température, le solvant d'extraction, la taille des particules et le coefficient de diffusion de solvant.

Il a été démontré que l'extraction par les solvants à température élevée permettait d'obtenir des rendements plus élevés en extraits secs que lorsqu'ils sont obtenu à température ambiante et qu'ils sont plus élevés pour l'extrait aqueux que méthanolique (Majhenic et al., 2007) ce qui est en accord avec nos résultats

Il est important de souligner que la méthode utilisée , le choix des solvants, ainsi que les conditions dans lesquelles l'extraction est effectuée (à chaud ou à froid), affectent tous le contenu total en polyphénols , et par conséquent affecte les activités biologiques médiées par ces métabolites (Lee et al.,2003).

V.4 Activités antimicrobiennes

V.4.1Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des extraits aqueux, alcooliques, flavonoïdes, alcaloïdes et fractions d'*A.halimus* et d'*E.alata* est testée *vis-à-vis* huit souches bactériennes de références et huit souches isolées

V.4.1.1 Résultat de l'antibiogramme

Toutes les souches ont été résistantes à l'Amoxicilline. Les souches de *staphylococcus aureus* ont été très sensibles aux Tobramycine et Erythromycine et résistantes à l'Oxacilline et l'Ofloxacin. Les souches *Serratia marcescens* et *Pseudomonas aeruginosa* ont été sensibles à l'Amikacine, Gentamicine et Trimethroprim et résistantes à colistine.

La souche *Bacillus cereus* a été très sensible à (Gentamicine et Trimethroprim) et résistant à l'Amikacine et colistino. La souche *Esherichia coli* a été sensible à l'Amikacine, Gentamycine et colistino et résistant à Trimethroprim (Figure V.4 ; Tableau V.4, V.5).



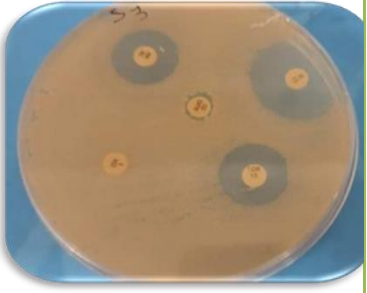
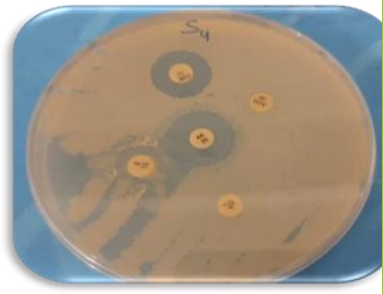
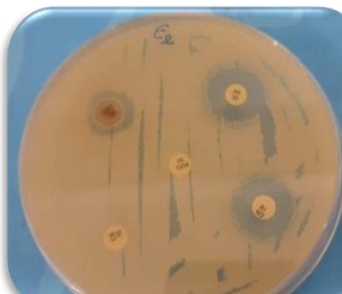

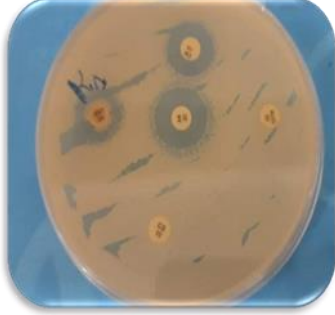
		
<i>Staphylococcus aureus</i> (S1)	<i>Staphylococcus aureus</i> (S2)	<i>Staphylococcus aureus</i> (S3)
		
<i>Staphylococcus aureus</i> (S4)	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Escherichia coli</i>
		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		

Figure V.4: Résultat de l'antibiogramme des souches isolées de l'hôpital Tourabi Boujamaa.

Tableau V.4: Moyennes des diamètres des zones d'inhibition en mm des souches isolées de l'hôpital Tourabi Boujamaa.

ATB Souche	Amikacine	Gentamicine	Trimethoprim	Colistine	
<i>Serratia marcescens</i>	16	17	14	6	
<i>Bacillus cereus</i>	6	17	16	6	
<i>Escherichia coli</i>	14	14	6	10	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17	15	14	6	
ATB Souche	Oxacilline	Tobramycine	Ofloxacine	Erythromycine	Amoxicilline
<i>Staphylococcus aureus</i> (S1)	6	15	6	18	6
<i>Staphylococcus aureus</i> (S2)	6	15	6	6	6
<i>Staphylococcus aureus</i> (S3)	6	17	6	17	
<i>Staphylococcus aureus</i> (S4)	6	16	6	12	6

Tableau V.5: Moyennes des diamètres des zones d'inhibition en mm des souches de références.

	AMK	GEN	NAL	AMX	CZO	CTX	COL	AMP
<i>Salmonella typhimurium</i>	12	7	-	7	6	6	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	14	-	-	16	-	-	8	-
<i>Streptococcus faecalis</i>	14	-	-	12	-	-	8	-
<i>Citrobacter freundii</i>	20	22	18	6	19	14	15	6
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	12	6	-	-	-	6	15
<i>Bacillus cereus</i>	6	16	6	-	6	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	28	18	22	8	20	22	18	6
<i>Bacillus subtilis</i>	6	15	6	-	6	-	-	-

COL: Colistine, NAL: acide nalidixique, AMK: Amikacin, AMP: Ampicilline, CZO: Cefazoline, CTX: Cefotaxime, GEN: Gentamicine, AMX: Amoxicilline

V.4.1.2 Méthodes de contact direct

L'essai antibactérien a été estimé par la méthode de contact direct, qui consiste à additionner aseptiquement l'extrait dans le milieu de culture. Les dilutions ont été réalisées dans le DMSO.

Tableau V.6 : Résultats de l'activité antibactérienne par méthode de contacte directe des extraits d'*E. alata* à la concentration de 1mg/ml.

	Extraits	AqM	AqR	MetOH	ACE	ALC	FL	Hx	Ch	AC	Aq
	Souches										
Souches de références	<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+
	<i>Streptococcus faecalis</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Citrobacter freundii</i>	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
	<i>Bacillus cereus</i>	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	<i>Bacillus subtilis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Souches isolée de L'hôpital	<i>Staphylococcus aureus S1</i>	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+
	<i>Staphylococcus aureus S2</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
	<i>Staphylococcus aureus S3</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
	<i>Staphylococcus aureus S4</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Serratia marcescens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) : sensible (-) : non sensible.

AqM : Aqueux avec macération, AqR : Aqueux avec montage à reflux, MetOH : Méthanolique. ACE : acétate d'éthyle, FL : l'extrait des flavonoïdes, ALC : l'extrait des alcaloïdes, Hx : la fraction hexane, Ch : la fraction chloroforme, Ac : la fraction acétate d'éthyle et Aq : la fraction aqueuse.

L'exploitation des résultats de l'activité antibactérienne par méthode de contact directe des extraits d'*E.alata* affichés sur le tableau V.6 a révélé que l'extrait méthanolique et la fraction acétate d'éthyle n'ont pas d'effet antibactérien sur toutes les souches testées que ce soit de références ou les souches isolées.

L'extrait aqueux avec macération a exercé une activité que sur *Staphylococcus aureus* de référence et *Enterococcus faecalis*.

L'extrait aqueux obtenu avec le montage à reflux a exercé un effet sur presque tous les souches de références (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Citrobacter freundii*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis*) et sur deux souches isolées (*Staphylococcus aureus S1* et *S3*). Par ailleurs la lecture de ces mêmes résultats laissé voir que les souches *Escherichia coli* de référence, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus S2* et *S4*, *Serratia marcescens*, *Bacillus cereus* et *Escherichia coli* isolées et *Pseudomonas aeruginosa* ont montré une résistance pour le même extrait.

Mais aussi, la fraction aqueuse a manifesté un effet sur un grand nombre de souches a savoir : *Staphylococcus aureus* de référence, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus S1*, *S2*, *S3* et *Escherichia coli* isolée de l'hôpital.

Par ailleurs, l'extrait d'acétate d'éthyle a exercé un effet positif que sur *Staphylococcus aureus S1* et *Staphylococcus aureus* de référence. Tandis que l'extrait des alcaloïdes a un effet que sur *Staphylococcus aureus S2*.

De plus l'extrait des flavonoïdes a un effet sur *Citrobacter freundii* et *Staphylococcus aureus S1*. De même la fraction hexane a donné un effet positif que sur *Staphylococcus aureus S1* et *Enterococcus faecalis*.

Egalement, la fraction chloroforme à un effet sur *Staphylococcus aureus* de référence, *Citrobacter freundii*, *Enterococcus faecalis* et *Escherichia coli*.

Pour tous les extraits et fractions d'*A.halimus* nous n'avons pas observé aucune activité antibactérienne pour toutes les souches par cette méthode.

➤ Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI

La concentration minimale inhibitrice d'un composé *vis-à-vis* d'une espèce bactérienne se défini comme étant la plus petite concentration du composé qui empêche tout développement de la bactérie donné (Calop et al., 2008).

L'investigation de concentration minimale inhibitrice pour l'extrait aqueux obtenu avec montage à reflux et la fraction aqueuse d'*E. alata* ayant fourni un effet antimicrobien au préalable par la méthode de contact directe testé a différentes concentrations a donné les résultats affichés sur le tableau V.7.

Tableau V.7 : Résultats de la concentration minimale inhibitrice de l'extrait aqueux sous reflux et la fraction aqueuse d'*E.alata*.

Concentrations Souches	0,833 mg/ml	0,666 mg/ml	0,5 mg/ml	0,333 mg/ml
<i>l'extrait aqueux sous reflux d'E. alata</i>				
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	+	+
<i>Citrobacter freundii</i>	+	+	+	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	-	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	+	+
<i>Staphylococcus aureus S1</i>	-	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus S3</i>	-	-	+	+
fraction aqueuse				
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	+	+
<i>Bacillus cereus de référence</i>	-	+	+	+
<i>Escherichia coli de référence</i>	-	-	-	+
<i>Staphylococcus aureus S1</i>	-	-	+	+
<i>Staphylococcus aureus S2</i>	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus S3</i>	+	+	+	+
<i>Escherichia coli isolé</i>	-	-	+	+

(+) croissance (-) absence de croissance

Le pouvoir antimicrobien selon la méthode de contact direct a révélé que l'extrait aqueux obtenu avec montage à reflux et la fraction aqueuse d'*E. alata* ont montré une activité contre la plupart des bactéries testées, et la concentration minimale inhibitrice (CMI) est située entre (0.833 mg/ml et 0,333mg/ml).

V.4.1.3 Méthode de diffusion des disques

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antibactérien des extraits et fractions d'*A.halimus* et *E.alata* par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosés solides, Mueller –Hinton.

L'activité antimicrobienne a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits à tester vis-à-vis huit (08) souches de référence dont cinq (05) bactéries Gram + et trois (03) bactéries Gram - et huit (08) souches responsable des infections nosocomial isolées à partir de l'hôpital Tourabi Boujamaa.

La méthode de disque a permis de déterminer l'action des extraits et fractions de deux plantes sur les différentes souches, celle-ci se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier préalablement imprégné de l'extrait ou fraction comme témoin de l'absence de la croissance bactérienne dans cette zone.

Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre et d'un extrait ou fraction à un autre. La variation de l'activité antimicrobienne des extraits et fractions explique les variations de leurs compositions chimiques.

Pour les extraits et fractions d'*A.halimus* (Figure V.5) l'effet a été très modéré et marqué que sur quelques souches.

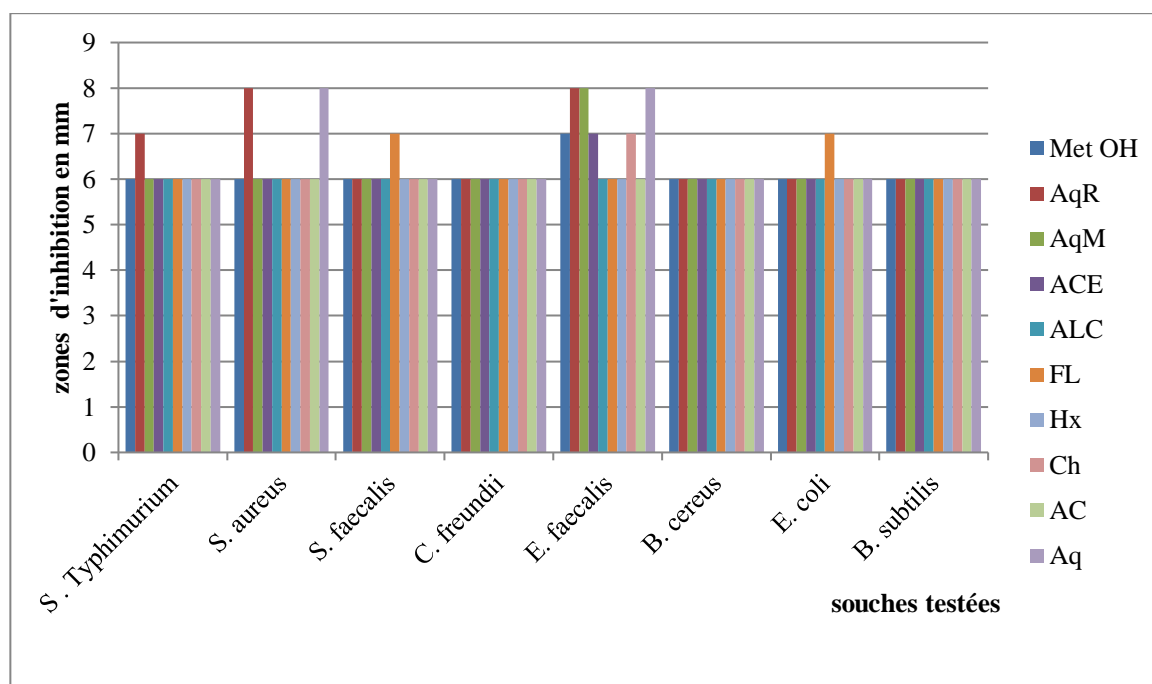


Figure V.5 : Résultats des diamètres (mm) des zones d'inhibition des extraits et fractions d'*A.halimus* (1mg/ml) sur les souches de références (Le diamètre du disque est inclus).

AqM : Aqueux avec macération, AqR : Aqueux avec montage à reflux, MetOH : Méthanolique, ACE : acétate d'éthyle, FL : l'extrait des flavonoïdes, ALC : l'extrait des alcaloïdes, Hx : la fraction hexane Ch : la fraction chloroforme, Ac : la fraction acétate d'éthyle et Aq : la fraction aqueuse. Valeurs exprimées en moyenne \pm ESM (n = 3).

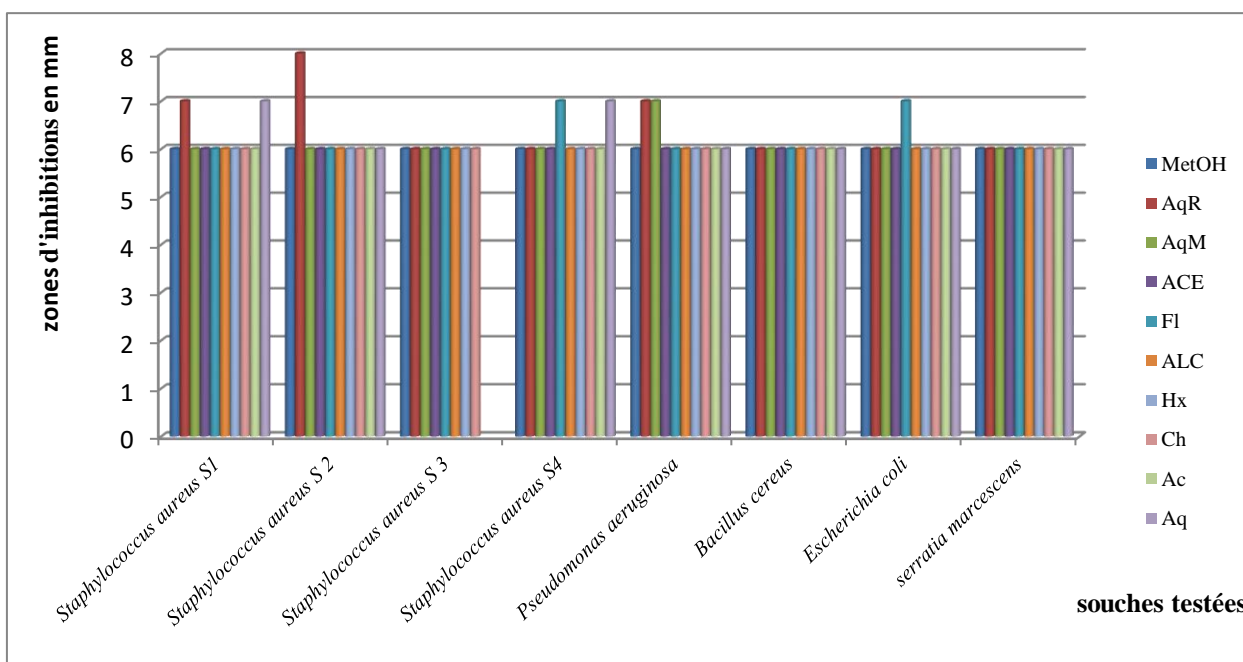


Figure V.6 : Résultats des diamètres (mm) des zones d'inhibition des extraits et fractions d'*A.halimus* (1mg/ml) sur les souches isolées (Le diamètre du disque est inclus).

AqM : Aqueux avec macération, AqR : Aqueux avec montage à reflux, MetOH : Méthanolique, ACE : acétate d'éthyle, Fl : l'extrait des flavonoïdes, ALC : l'extrait des alcaloïdes, Hx : la fraction hexane Ch : la fraction chloroforme, Ac : la fraction acétate d'éthyle et Aq : la fraction aqueuse. Valeurs exprimées en moyenne \pm ESM (n = 3).

Les extraits d'*A.halimus* n'ont pas exercé aucune activité inhibitrice envers les germes bactériens. Des diamètres de 8 mm à la concentration de 1mg/ml avec *Enterococcus faecalis* pour les extraits aqueux et fraction aqueuse, et avec l'extrait aqueux sous reflux et fraction aqueuse sur *Staphylococcus aureus*, ainsi avec *Staphylococcus aureus S2* pour l'extrait aqueux obtenu avec reflux ont été les effets les plus supérieurs.

Pour les extraits d'*E.alata* on voit que l'extrait méthanolique a exercé un effet modéré et que sur quelques souches de références, les diamètres de $9 \pm 1,73$ mm à la concentration de 1mg/ml avec *Staphylococcus aureus* et $8 \pm 0,57$ mm à la concentration de 1mg/ml avec *Bacillus cereus* ont été les effets les plus supérieurs (figure V.7). Aucun effet n'a été marqué avec les souches isolées pour le même extrait.

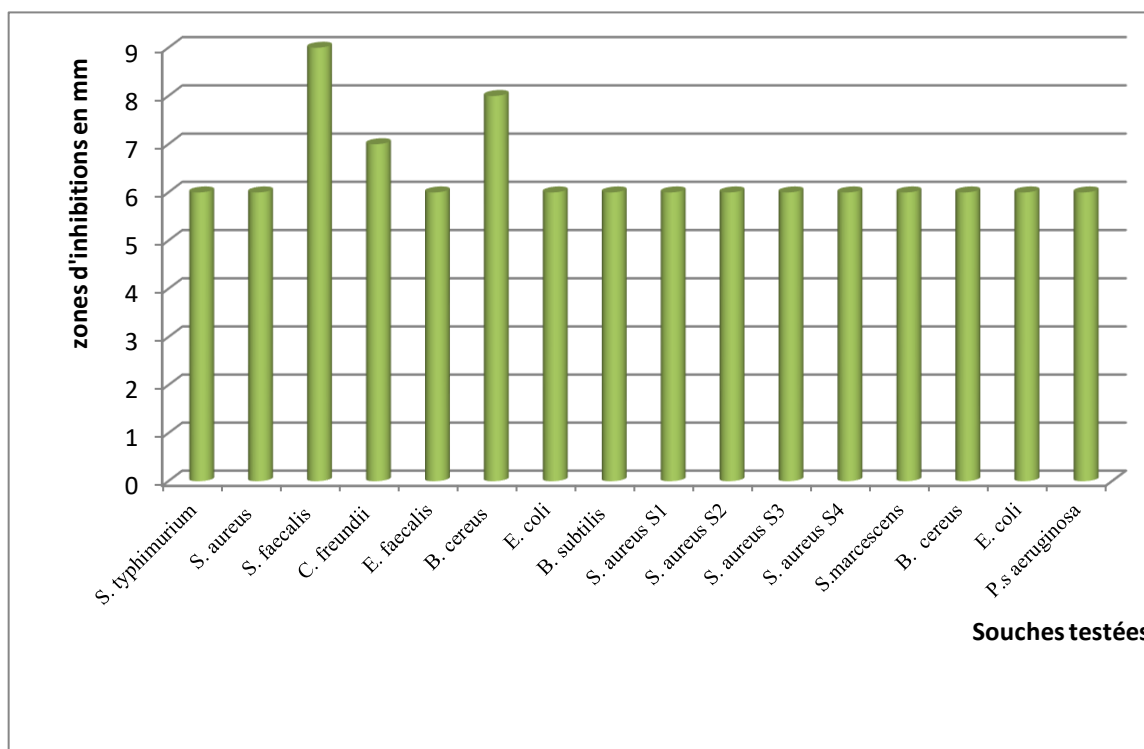


Figure V.7: Résultats des diamètres (mm) des zones d'inhibition d'extrait méthanolique, (1mg/ml) d'*E. alata* (Le diamètre du disque est inclus). Valeurs exprimées en moyenne \pm ESM (n = 3).

Parallèlement, l'extrait *aqueux* de la même plante obtenue avec macération a eu un effet marqué sur quelque souche de références et non sur d'autres. L'effet le plus élevé marqué par cet extrait avec une concentration de 1 mg/l a été exprimé par un diamètre de $14 \pm 1,73$ mm (Figure V.8) pour *Salmonella typhimurium* suivi par *Streptococcus faecalis* et *Bacillus cereus* avec un diamètre de 8 ± 1 mm.

nous n'avons remarqué aucun effet pour le même extrait pour les autres souches de références (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*) et les souches isolées.

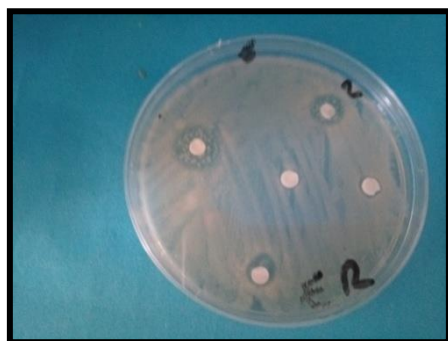


Figure V.8 : Photo de l'effet inhibiteur de l'extrait aqueux obtenue avec macération d'*E.alata* sur *Salmonella typhimurium*.

1)1mg/ml, 2) 0,833mg/ml, 3) 0,666 mg/ml, 4) 0,5 mg/ml, 5) 0,333 mg/ml.

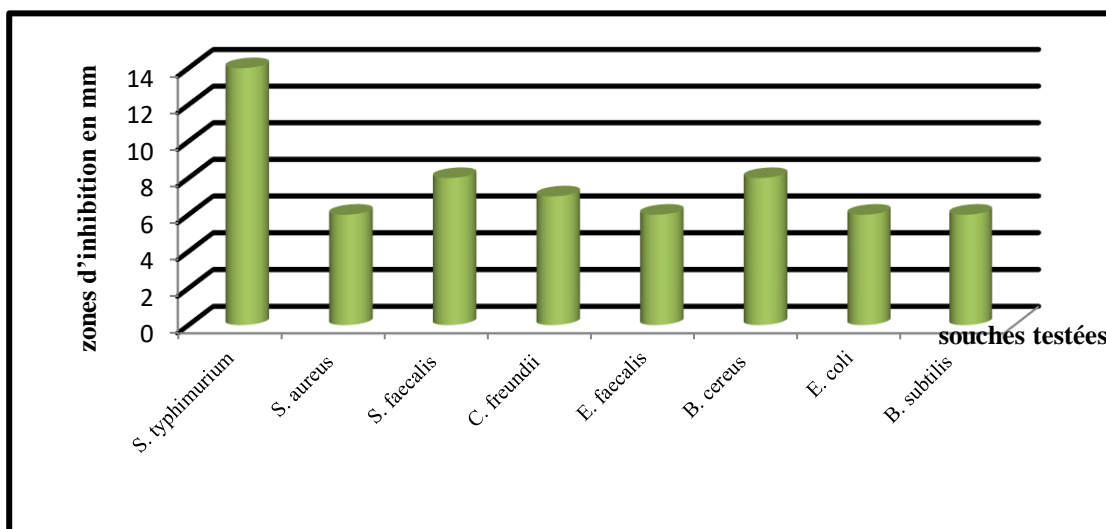


Figure V.9 : Résultats des diamètres (mm) des zones d'inhibition d'extrait aqueux (1mg/ml) d'*E.alata* obtenu avec macération (Le diamètre du disque est inclus). Valeurs exprimées en moyenne± ESM (n = 3).

Pour l'extrait aqueux obtenu avec montage sous reflux d'*E.alata*, nous voyons que l'extrait à exercer un effet inhibiteur presque sur toutes les souches de références et quelques souches isolées et les diamètres exploités par l'application des extraits ont monté clairement que les zones d'inhibition diminuent avec la diminution de la concentration d'extrait appliquée.

L'effet le plus élevé a été celui appliqué sur *Bacillus subtilis* et qui a été traduit par un diamètre de $20 \pm 1,73$ mm suivi par un diamètre de $15 \pm 1,73$ mm sur *Bacillus cereus* et des diamètres de $12 \pm 1,73$ mm sur *Streptococcus faecalis* et *Enterococcus faecalis* avec une concentration de 1mg/ml. Un diamètre de $10 \pm 1,73$ mm a été obtenu avec *Citrobacter freundii* et $10 \pm 0,57$ *Escherichia coli* par la même concentration indique les effets les plus

bas.

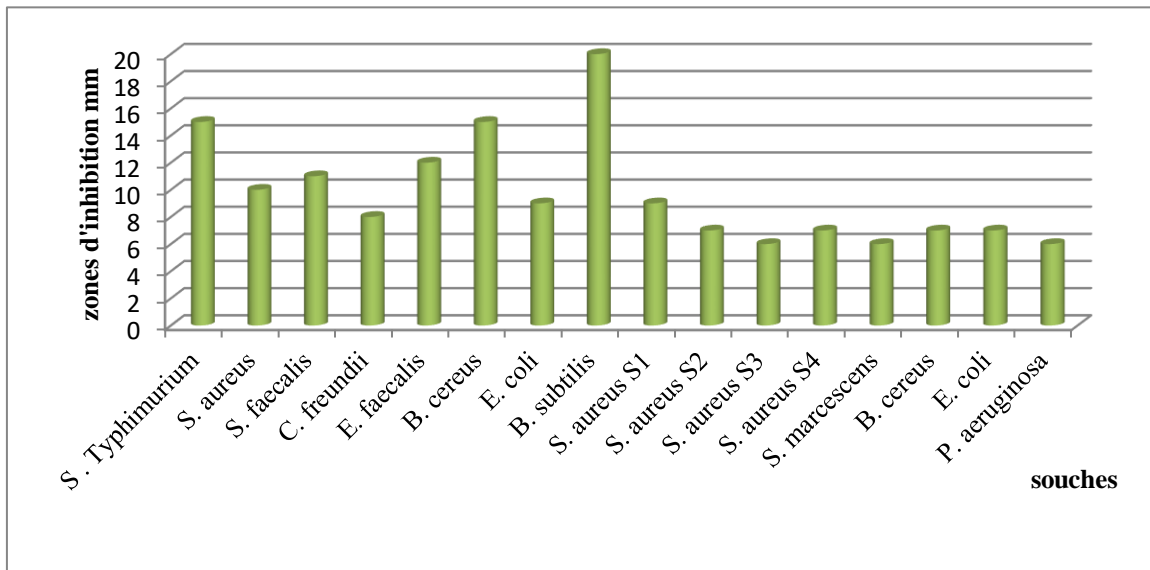
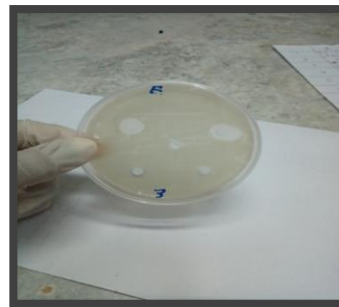


Figure V.10 : Résultats des diamètres (mm) des zones d'inhibition d'extrait aqueux (1mg/ml) d'*E.alata* obtenu avec montage sous reflux (Le diamètre du disque est inclus). Valeurs exprimées en moyenne \pm ESM (n = 3).



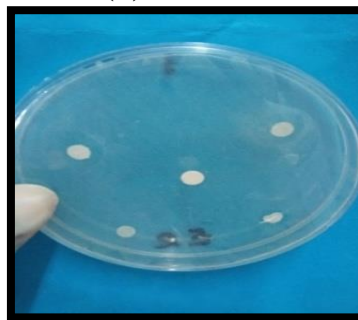
(a)



(b)



(d)



(e)

Figure V.11: Photo de l'effet inhibiteur de l'extrait aqueux d'*E.alata* obtenu avec montage sous reflux sur (a) *Bacillus subtilis* (b) *Bacillus cereus*, (c) *Enterococcus faecalis* et (d) *Citrobacterfreundii* (1) 1mg/ml, 2) 0,833mg/ml, 3) 0,666 mg/ml, 4) 0.5 mg/ml, 5) 0,333 mg/ml.

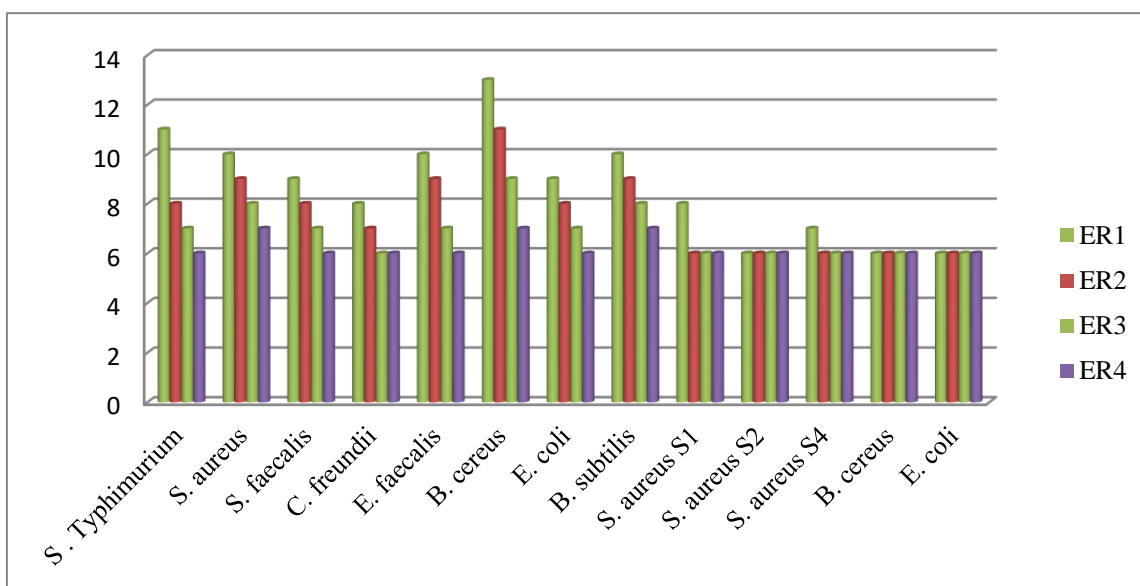
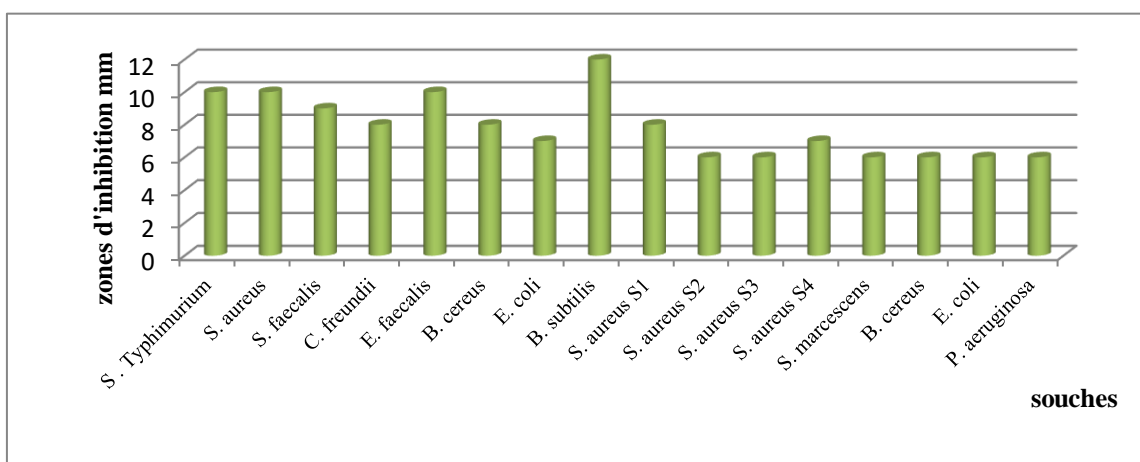


Figure V.12 : Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait obtenu avec montage sous reflux d'*E.alata*, en mm (le diamètre du disque est inclus). Valeurs exprimées en moyenne \pm ESM (n = 3).

ER1 : extrait aqueux sous reflux0, 833mg/ml, **ER2** : extrait aqueux sous reflux0, 666 mg/ml, **ER3** : extrait aqueux sous reflux0, 5 mg/ml, **ER4** : extrait aqueux sous reflux0, 333 mg/ml.

Parrallèlement, on a remarqué des effet avec la fraction aqueuse quelque soit pour les souches de réérences ou les souches isolées (figure V.13) où l'effet le plus elevé a été marqué sur *Bacillus subtilis* de référence (12 mm) suivi par un diamètre de $10 \pm 1,15$ mm sur *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*. Pour les souches isolées le diamètre de $9 \pm 0,57$ mm indique l'effet le plus élevé sur *Staphylococcus aureus* S1.



Figures V.13: Résultats des diamètres (mm) des zones d'inhibition de fraction aqueuse (1mg/ml) d'*E.alata* (Le diamètre du disque est inclus).

➤ **Concentration minimales inhibitrices (CMI)**

Les CMI ont été calculées uniquement pour les extraits qui ont préalablement exhibé un effet antibactérien important. Ainsi l'extrait sélectionné a été l'extrait aqueux sous reflux d'*E.alata*, d'après les résultats d'armatogrammes, l'ensemble des bactéries testées ont révélé une sensibilité envers le dit extrait. Les résultats des CMI de l'extrait aqueux sous reflux sont résumés dans le tableau V.8.

Tableau V.8 : Valeurs des CMI de l'extrait aqueux sous reflux.

Concentration µg/ml	333	166,5	83,25	41,62	20,81	10,4	5,20	2,60	1,30	0,65
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Citrobacterfreundii</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterococcusfaecalis</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Streptococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

(+) : croissance (-) : absence de croissance.

Bacillus subtilis a été la souche la plus sensible avec une CMI de 1,3 µg/ml; alors que *Escherichia coli* été la souche la plus résistante avec une CMI de 83,25 µg/ml ce qui traduit une diversité dans les réactions des différentes souches testées vis-à-vis cet extrait.

D'après ces résultats, nous avons remarqué qu'*E.alata* a des propriétés antibactériennes très appréciées et cela justifie son utilisation dans les traitements traditionnels.

Nos résultats ont été cohérents avec les résultats obtenus par Kessal et Bouafia (2003), leurs études réalisés sur l'extrait méthanolique de la plante entière de l'*E. alata* de la région de Ouargla, dans laquelle ils ont enregistré des valeurs de 9,63 mm, 7,31mm et de 15.32mm contre l'*E.coli*, *P. aeruginosa*, et *S. aureus* respectivement.

D'autres études sur l'*E. alata* prélevée de la région de Ouargla ont montré que le meilleur pouvoir d'inhibition a été noté contre *S. aureus* comparativement à *E.coli* et *P. aeruginosa* (Chebouat et al., 2014), Bussmanna et al (2008), ont utilisé l'extrait éthanolique d'*E. americana* du nord du Pérou a donné des zones d'inhibition de 22 mm, 8 mm et des MIC de 32 et 64 mg/ml contre la croissance de *S.aureus* et *E.coli* respectivement.

Pour les extraits et fractions d'*A. halimus* l'activité a été faible ce qui est en accord avec les travaux de Guettoche, 2021 où les résultats obtenus ont montré que l'extrait d'acétate d'éthyle a présenté une faible efficacité presque sur tous les germe testés.

Aussi abdelrahman et al. 2011 ont trouvé des faibles zones d'inhibition avec l'extrait méthanolique d'*A. halimus* (10mm sur *B.cereus*, 5 mm sur *S. aureus* et aucun effet sue *E.Coli* et un effet sur *B.cereus* de 9 mm avec l'extrait hexanique)

Abdelsoud (2016) a travaillé sur les flavonol d'*A.halimus*, ou il a trouvé une zone d'inhibition de 10 mm sur *S. aureus*, 11 mm sur *E. fecalis* et aucun effet sur *P. aerogenosa*, *E.Coli* et *A. Baumanii*.

En général, nos résultats concordent avec les travaux de Lambert et al. (2001), qui ont testé l'effet antibactérien des extraits de plusieurs plantes contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Les résultats ont indiqué ainsi que *Staphylococcus aureus* était plus sensible qu'*Escherichia coli*.

Des résultats similaires ont été enregistrés avec d'autres travaux, Akin et Aktumdek (2009), en testant les extraits d'*Eucalyptus camaldulensis* contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, ces auteurs ont indiqué que *Staphylococcus aureus* est le seul à montrer une certaine sensibilité. Cette sensibilité plus marqué des bactéries à Gram positif a été aussi déjà observé par plusieurs auteurs (**Cox et al., 2000 ; Freidman et al., 2002 ; Burt, 2004 ; Lefsih et al., 2010**).

Contrairement à nos résultats, plusieurs auteurs ont démontré que les bactéries à Gram(-) peuvent être les plus sensibles (**Moreira et al., 2005**).

D'après Kalembe et Kunika (2003), la sensibilité d'un microorganisme aux extraits de plantes dépend des propriétés de l'extrait et le microorganisme lui-même. Il est bien connu que les bactéries à Gram positif sont plus sensibles que les bactéries à Gram négatif (**Cimanga et al., 2002**).

Selon **Poole, 2001 ; Burt, 2004** et **Busatta et al., 2008**, la grande résistance des bactéries à Gram négatif est liée en partie à la complexité de l'enveloppe cellulaire de ces microorganismes qui contient une double membrane, contrairement à la structure membranaire simple des bactéries à Gram positif.

Cependant la comparaison de l'efficacité des extraits à travers les différents publications reste difficile à réaliser, et cette difficulté réside au niveau des différents paramètres externes incontrôlables : comme la composition chimique qui varie selon les conditions environnementales de la plante, même au sein d'une même espèce.

Les mécanismes d'action des extraits et leur sélectivité envers certaines bactéries restent jusqu'à présent mal élucidés.

Rhayour (2003) a montré que les composés phénoliques seuls ou associés avec les antibiotiques attaquent directement la bactérie en se fixant sur son enveloppe cellulaire, entraînant un déséquilibre de la perméabilité membranaire et un blocage de la phosphorylation oxydative qui représente la source de la vie respiratoire.

Les propriétés antibactériennes de ces composés sont en partie liées à leurs caractères lipophiles menant à l'accumulation au niveau des parois bactérienne,

- Perturbant ainsi le fonctionnement et la perméabilité des membranes cellulaires ;
- dégradation de la paroi cellulaire (**Helander et al., 1998**) ;
- Dommages de la membranes cytoplasmique (**Ultee et al., 2002**);
- Dommage des protéines membranaires (**Juven et al., 1994 ; Ultee et al., 1999**) ;
- Fuites de contenu des cellules;
- Coagulation du cytoplasme et l'épuisement de force motrice des protons (**Ultee et Smid, 2001**).

Donc les activités antimicrobiennes d'un extrait peuvent changer par sa composition chimique, par les génotypes, aux méthodes employées pour évaluer l'activité antimicrobienne (la technique de diffusion par disque ou par méthode de contact directe) les résultats obtenus par chacune de ces deux méthodes peuvent être différents ; selon le choix et conditions physiologique des microorganismes, aux doses des extraits utilisées, le choix de solvant pour solubiliser les extraits. Ceux-ci autant de facteurs pouvant expliquer parfois des résultats contradictoires des différentes études.

V.4.2 Activité antifongique

À fin d'évaluer l'activité antifongique de nos extraits et les fractions des deux plantes *E.alata* et *A.halimus* et de connaître la qualité et l'implication de ces extraits dans la réduction de la flore fongique , un suivi de la croissance radiale mycélienne durant 7 jours d'incubation en moyenne a été fait. L'évaluation de la croissance radiale a été réalisée sur milieu PDA acidifié.

Les résultats du pourcentage d'inhibition des extraits méthanoliques, acétate d'éthyle aqueux sous reflux et aqueux d'*E.alata* montrent que l'extrait aqueux sous reflux a exercé une activité inhibitrice sur toutes les souches mycéliennes testées avec un pourcentage d'inhibition variant : $64,44 \pm 0,96\%$ sur *Aspergillus ochrasus*, $60 \pm 1\%$ sur *Aspergillus flavus* et $57,55 \pm 0,61\%$ sur *Aspergillus niger* (figure V.17), ces valeurs ont

été supérieures à celles obtenues avec l'extrait aqueux pour les trois souches à la concentration de 0,75mg/ml. Par ailleurs aucune activité n'a été notée pour tous les souches fongiques avec les extraits méthanoliques et acétate d'éthyle de même plante.

Pour les fractions : la fraction hexane, la fraction chloroforme et la fraction acétate d'éthyle n'ont aucune activité antifongique sur les souches testés tandis que la fraction aqueuse a exercé une activité même des fois supérieur de l'extrait aqueux brute sur ces souches avec un pourcentage d'inhibition variant : $67,28 \pm 1,15\%$ sur *Aspergillus ochrasus*, $61,01 \pm 0,58\%$ sur *Aspergillus flavus* et $52,55 \pm 0,89\%$ sur *Aspergillus niger* (figure V.15).

Les alcaloïdes ont donné des pourcentages d'inhibition élevée et variant : $69,12 \pm 0,96\%$ sur *Aspergillus ochrasus*, $63,27\%$ sur *Aspergillus flavus* et $59,74\%$ sur *Aspergillus niger* (figure V.14), pour les flavonoïdes les pourcentages d'inhibitions ont été variantes : $51,38 \pm 1,36\%$ sur *Aspergillus ochrasus*, $48,28 \pm 0,69\%$ sur *Aspergillus flavus* et $39,58 \pm 0,79\%$ sur *Aspergillus niger*.

La lecture sommaire des différents supports graphiques donnant l'effet des extraits testés sur les souches étudiées ont montré que les extraits ont exercés un effet antifongique variable sur les souches testées. Cet effet a été différent d'une extrait à un autre et d'une souche à une autre. En général, l'extrait aqueux sous reflux a un pouvoir antifongique plus marqué que les autres extraits.

Les résultats obtenus ont témoigné une activité antifongique plus au moins efficace pour les deux plantes contre les souches testées. La lecture globale des différents résultats collectés et consignés dans les supports graphiques, affichent un retard de la croissance mycélienne proportionnel à la concentration de l'extrait ajoutée au milieu.

Suivant ces données nous avons pu classer l'ordre d'efficacité de l'activité antifongique de ces extraits décroissante comme suit: extrait des alcaloïdes > fraction aqueuse > extrait aqueux sous reflux > extrait aqueux > extrait des flavonoïdes > extrait méthanolique > extrait d'acétate d'éthyle > les fractions. Cette différence peut être à l'origine de la composition chimique différente entre les extraits et les fractions.

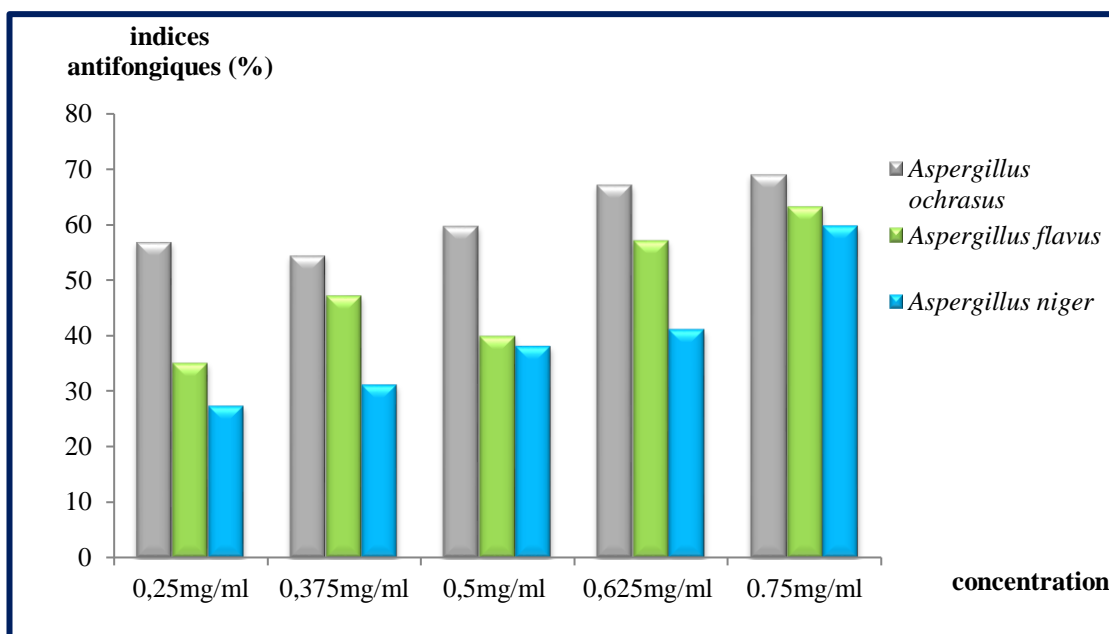


Figure V.14 : Moyennes des indices antifongiques des différentes concentrations de l'extrait des alcaloïdes d'*E. alata* sur *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus ochrasus*. Valeurs exprimées en moyenne \pm ESM (n=3).

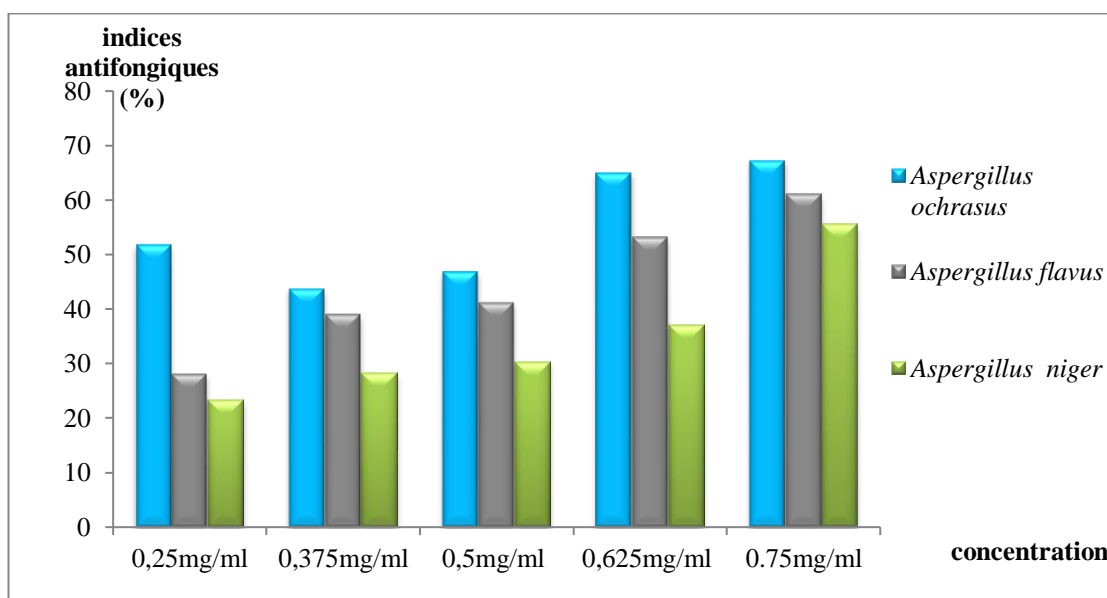


Figure V.15 : Moyennes des indices antifongiques des différentes concentrations de la fraction aqueuse d'*E. alata* sur *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus ochrasus*. Valeurs exprimées en moyenne \pm ESM (n=3).

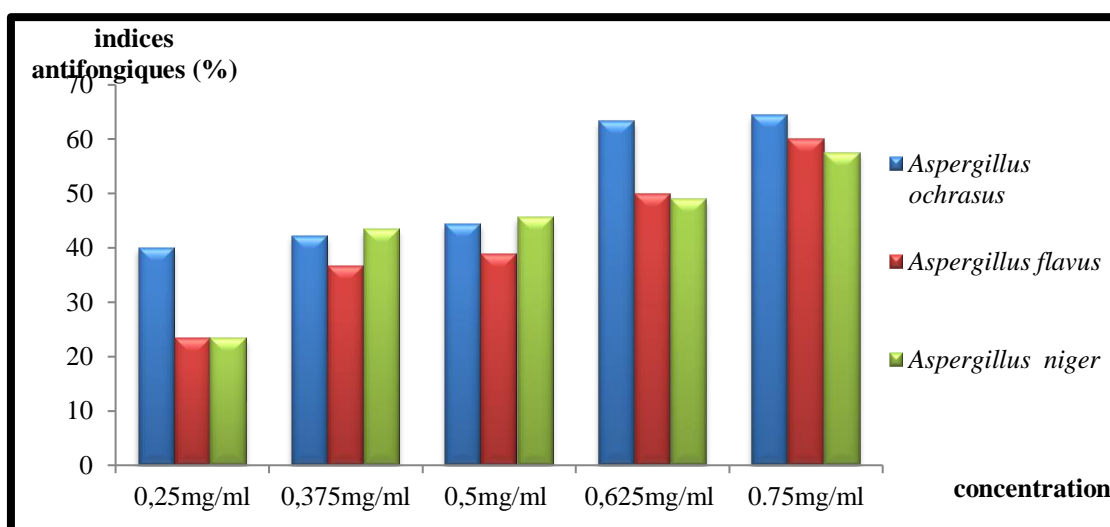


Figure V.16 : Moyennes des indices antifongiques des différentes concentrations de l'extrait aqueux sous reflux d'*E.alata* sur *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus ochrasus*. Valeurs exprimées en moyenne \pm ESM (n=3).

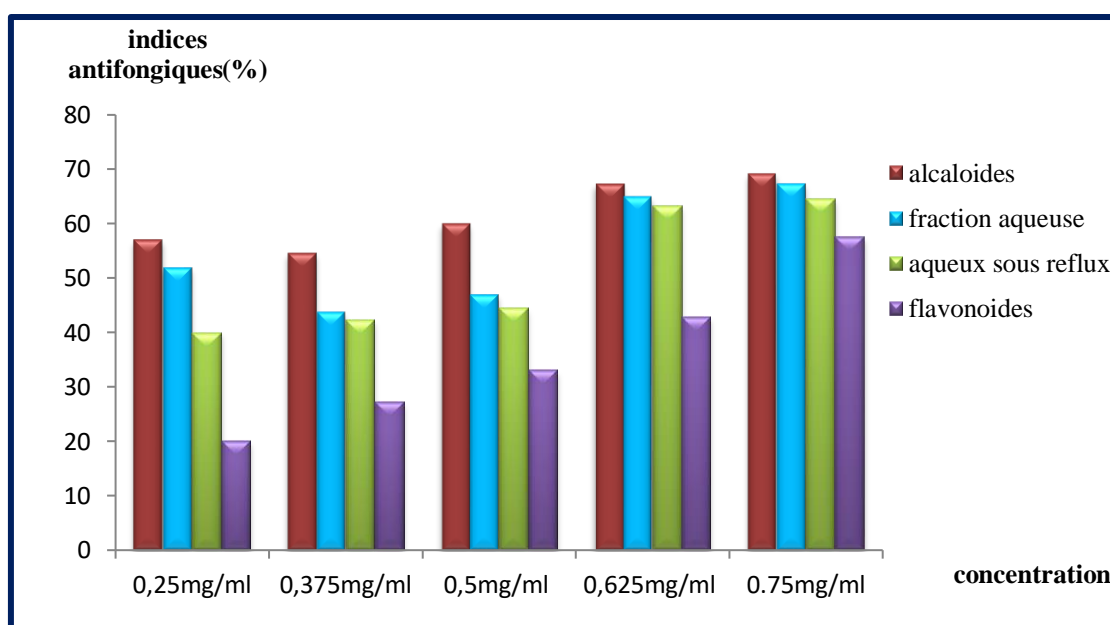


Figure V.17 : Moyennes des indices antifongiques des différentes concentrations des extraits aqueux sous reflux, alcaloides, flavonoïdes et fraction aqueuse d'*E.alata* sur *Aspergillus ochrasus*. Valeurs exprimées en moyenne \pm ESM (n=3).

L'extrait aqueux obtenu avec macération d'*E.alata* n'a exercé aucune activité sur *Aspergillus ochrasus*.

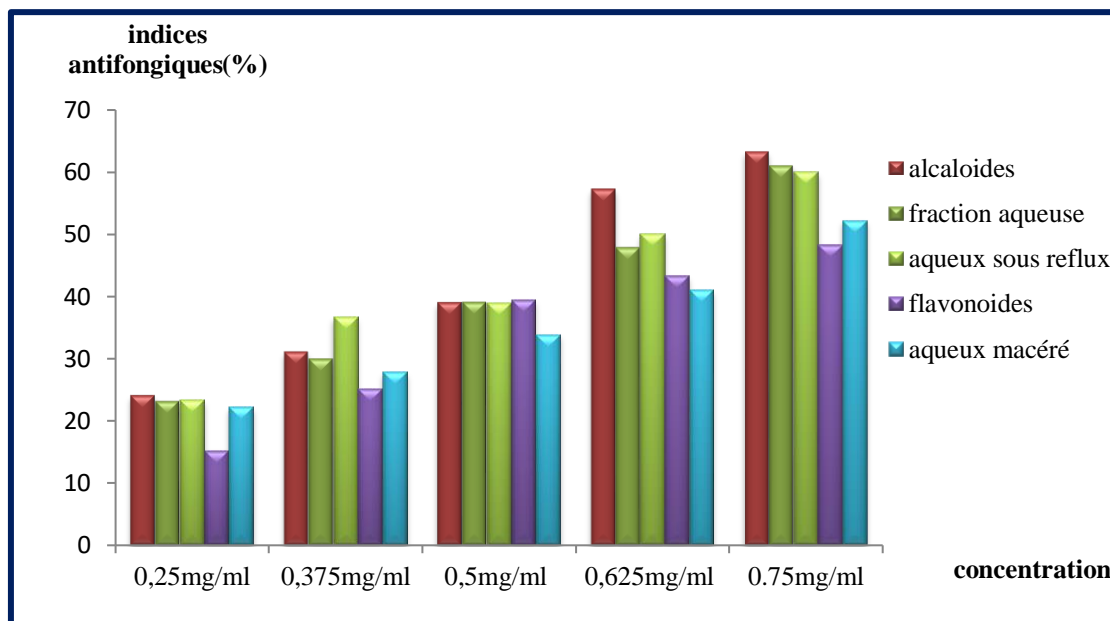


Figure V.18 : Moyennes des indices antifongiques des différentes concentrations des extraits aqueux macéré et aqueux sous reflux, alcaloïdes, flavonoïdes fraction aqueuse d'*E.alata* sur *Aspergillus flavus*. Valeurs exprimées en moyenne \pm ESM (n=3).

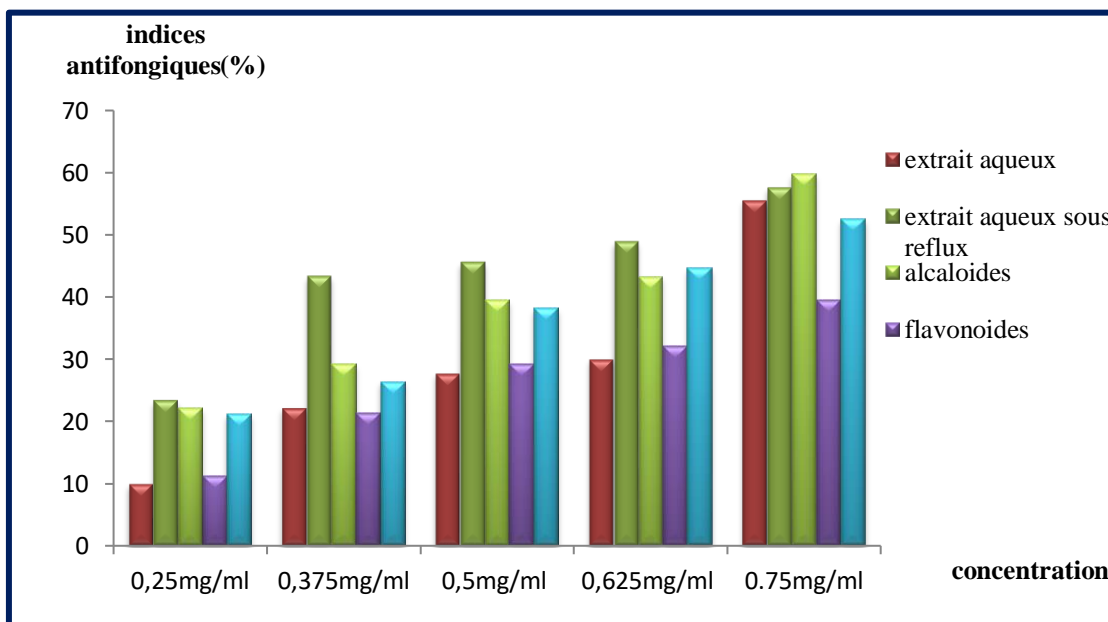


Figure V.19 : Moyennes des indices antifongiques des différentes concentrations des extraits aqueux et aqueux sous reflux, alcaloïdes, flavonoïdes fraction aqueuse d'*E.alata* sur *Aspergillus niger*. Valeurs exprimées en moyenne \pm ESM (n=3).

Ghanem et El-Magly (2008), ont travaillé sur les extraits et fractions d'*E.alata* d'Egypte sur *Aspergillus fumigatus*. L'extrait méthanolique est le seul qui a donné un effet antifongique alors que, l'extrait aqueux et les différentes fractions n'ont pas aucun effet.

Une autre étude a évalué les effets d'*E. major* sur la croissance fongique et la production d'aflatoxine (AF) par *Aspergillus parasiticus*. Il a été constaté que les extraits méthanoliques des parties aériennes et des racines de la plante ont inhibé la croissance fongique et la production d'aflatoxine B1 (AFB1) de manière dose-dépendante. En outre, les extraits d'huile essentielle des parties aériennes de la plante ont significativement inhibé la croissance fongique à la plus forte concentration de 1000 µg/ml sans aucun effet évident sur la production d'AFB1 à toutes les concentrations utilisées (0-1000 µg/ml) (Bagheri-Gavkosh et al., 2009).

Pour les extraits d'*A.halimus*, les pourcentages d'inhibition ont été variés : 22,82 ± 0,46% et 12,81 ± 0,91% sur *Aspergillus ochrasus*, 25,33 ± 0,96 % et 23,33 ± 1,42% sur *Aspergillus flavus* et 28,22 ± 0,87% et 18,88 ± 1,52% sur *Aspergillus niger* pour les extraits aqueux et aqueux sous reflux respectivement à la concentration de 0,75mg/ml.

Par ailleurs aucune activité n'a été notée pour tous les souches fongiques avec l'extrait méthanolique, acétate d'éthyle, les différentes fractions. Tandis que les flavonoïdes ont des faibles pourcentages d'inhibition sur *Aspergillus ochrasus* et *Aspergillus flavus*.

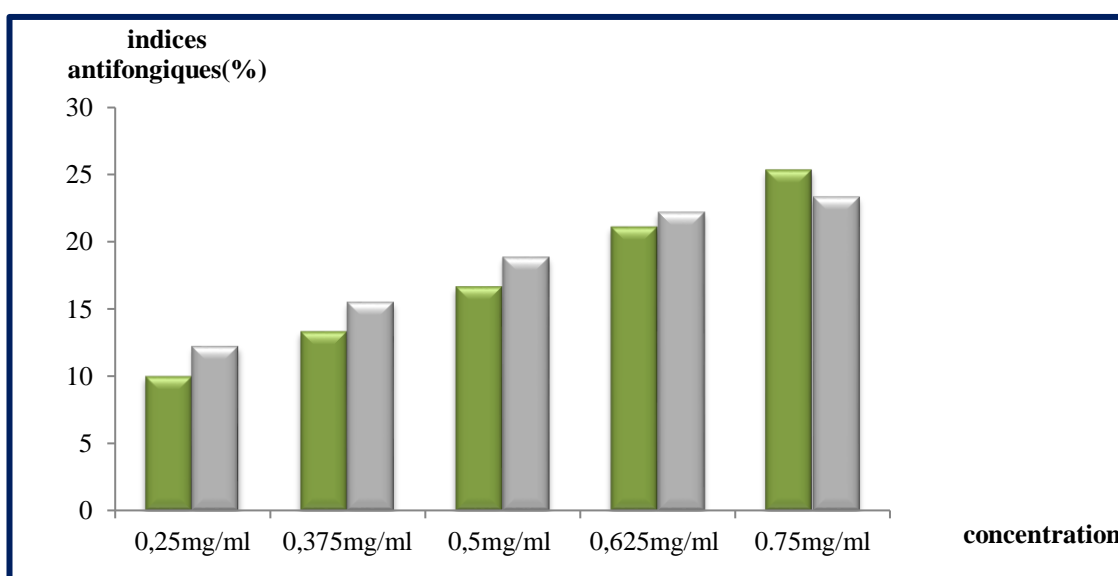


Figure V.20: Moyennes des indices antifongiques des différentes concentrations des extraits aqueux (■) et aqueux sous reflux (□) d'*A.halimus* sur *Aspergillus flavus*. Valeurs exprimées en moyenne ± ESM (n=3).

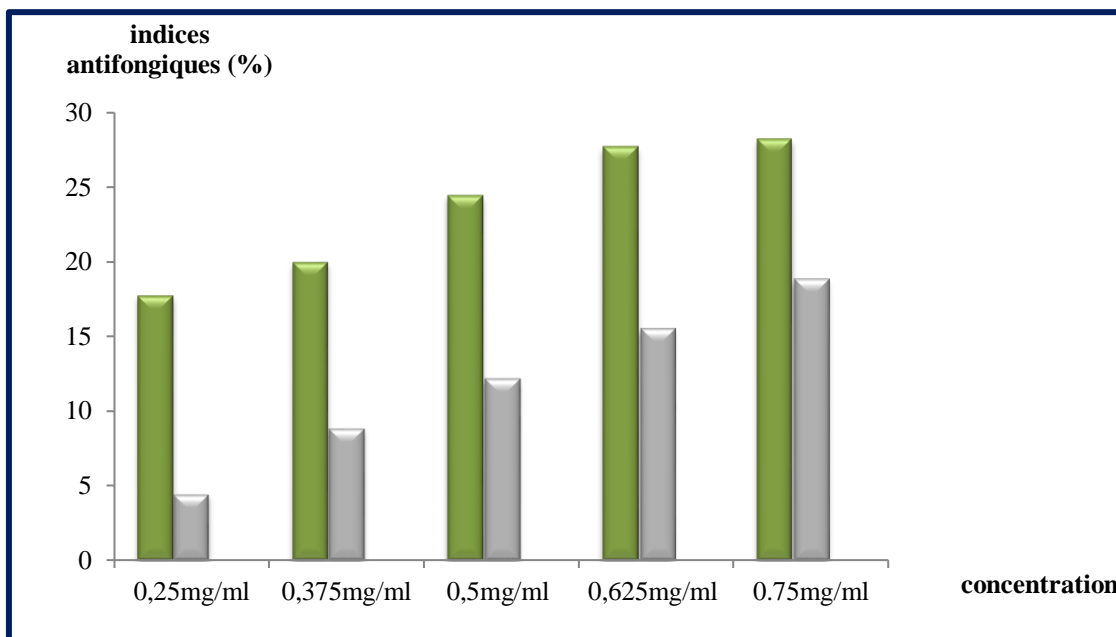


Figure V.21 : Moyennes des indices antifongiques des différentes concentrations des extraits aqueux (■) et aqueux sous reflux (□) d'*A.halimus* sur *Aspergillus niger*. Valeurs exprimées en moyenne \pm ESM (n=3).

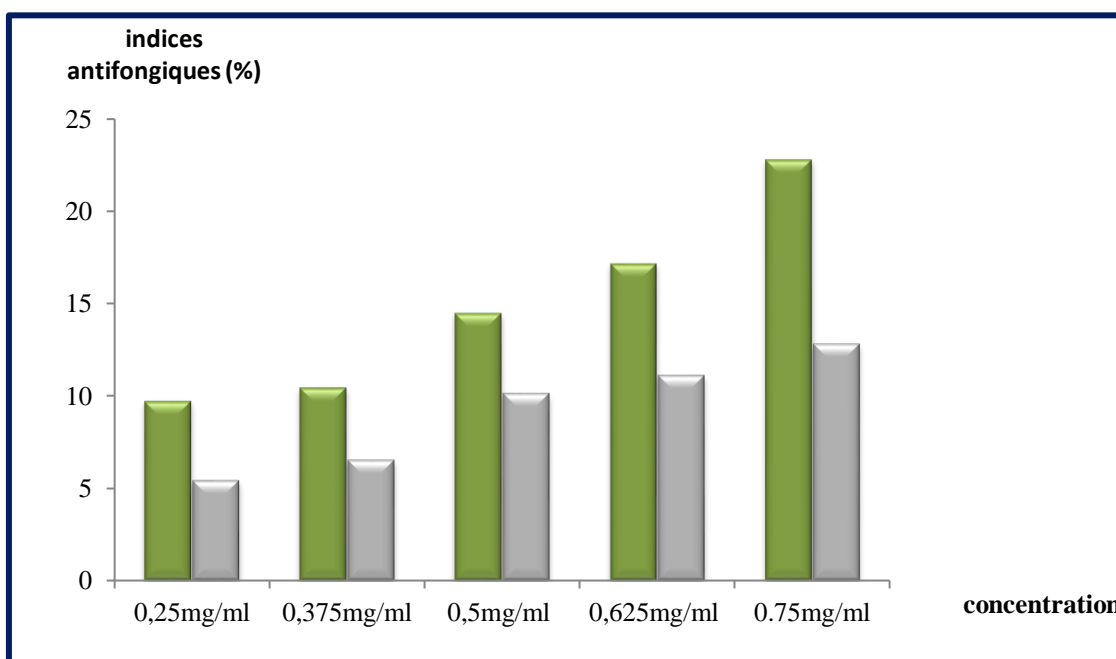


Figure V.22 : Moyennes des indices antifongiques des différentes concentrations des extraits aqueux macéré (■) et aqueux sous reflux (□) d'*A.halimus* sur *Aspergillus ochrasus*. Valeurs exprimées en moyenne \pm ESM (n=3).

Nous pouvons dire que toutes les souches fongiques sont sensibles à une augmentation des doses testées ; ceci se traduit par une augmentation progressive du pourcentage d'inhibition. Cette action inhibitrice est donc « dose dépendante ».

En général les extraits ont exercés un effet antifongique variable sur les souches testées. Cet effet a été différent d'un extrait à un autre, d'une souche à une autre et d'une plante à une autre. En général, les extraits d'*E.alata* ont un pouvoir antifongique plus marqué que les extraits d'*A.halimus* (Figure V.23).

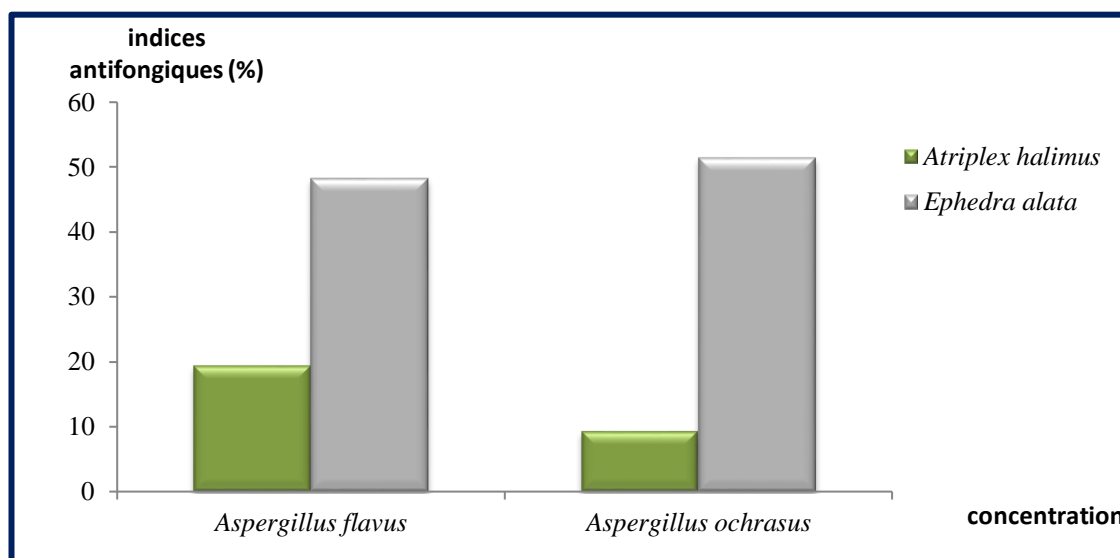


Figure V.23 : Moyennes des indices antifongiques des extraits des flavonoïdes d'*A.halimus* et d'*E.alata* à la concentration de 0,75 mg/ ml sur *Aspergillus ochrasus* et *Aspergillus flavus*. Valeurs exprimées en moyenne \pm ESM (n=3).

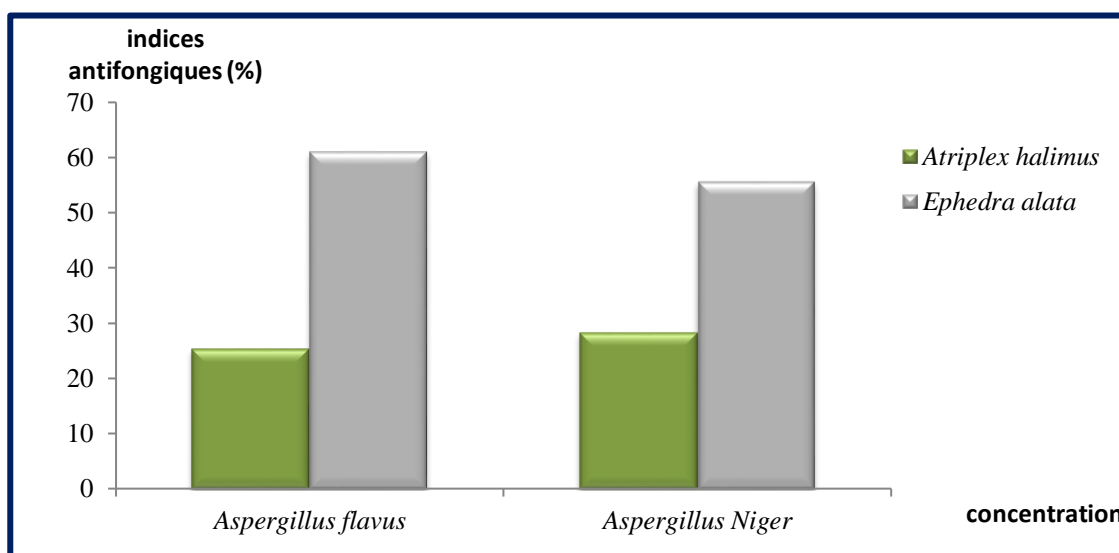


Figure V.24 : Moyennes des indices antifongiques des extraits aqueux macérés d'*A.halimus* et d'*E.alata* à la concentration de 0,75 mg/ ml sur *Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus*. Valeurs exprimées en moyenne \pm ESM (n=3).

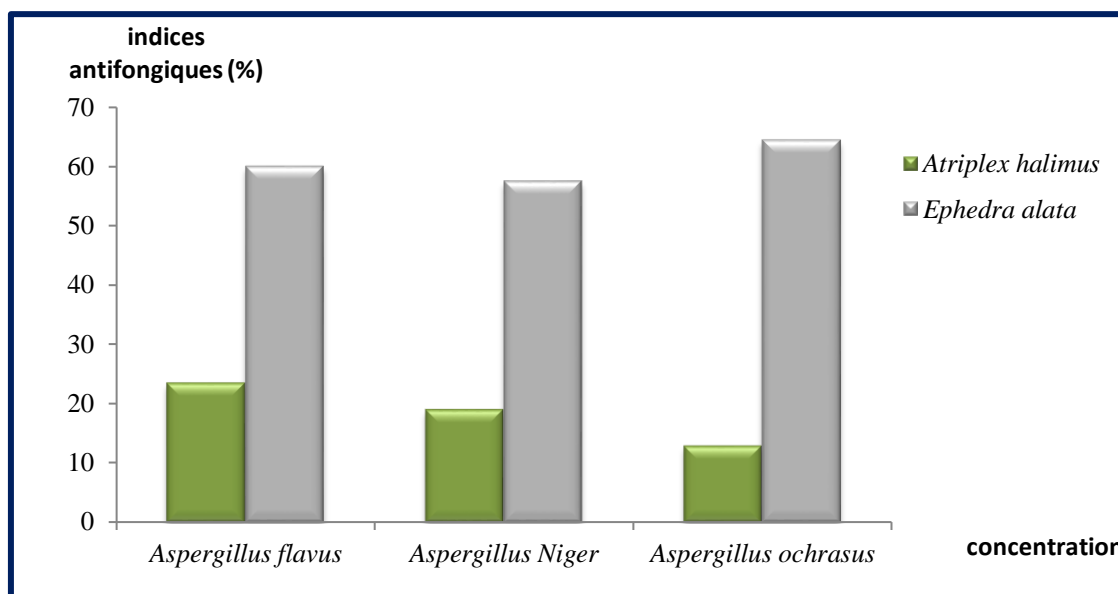


Figure V.25 : Moyennes des indices antifongiques des extraits sous reflux d'*A.halimus* et d'*E.alata* à la concentration de 0,75 mg/ ml sur *Aspergillus ochrasus*, *Aspergillus Niger* et *Aspergillus flavus*. Valeurs exprimées en moyenne \pm ESM (n=3).

L'exploitation des résultats de l'activité antifongique des différents extraits des deux plantes, a révélé que l'intensité de cette activité a été variable selon plusieurs facteurs entre autre le solvant utilisée, la méthode d'extraction et la souche investiguée .

En conclusion, en raison de la complexité de la composition chimique des extraits, il a été difficile de donner une idée précise sur leur mode d'action antifongique. Il est fort probable aussi que chacun des constituants possède son propre mécanisme voir un cas d'antagonisme probable. Il est bien connu aujourd'hui que l'action antifongique des substances dotées de pouvoir antifongique ont pour cible prédictive la membrane cytoplasmique (**Carolina et al., 2011**).

Les composants des extraits affectent la perméabilité et aussi d'autres fonctions dans les membranes cellulaires. Ces composés peuvent traverser les membranes cellulaires, pénètrent ainsi à l'intérieur de la cellule et interagissent avec des sites critiques intracellulaires tels que les enzymes et les protéines, ce qui conduit à la mort cellulaire (**Omidbeygi et al., 2007 ; Cristani et al., 2007**).

Les flavonoïdes sont responsables des processus de balayage ou chélateurs et peuvent également perturber les membranes microbiennes (**Kessler et al., 2003**). Par ailleurs, les alcaloïdes renferment un effet détoxifiant et possèdent une très bonne activité antifongique (**Zee-cheng, 1997**).

V.5 Activité antioxydante

Les antioxydants naturels sont présents dans l'alimentation; pour la plupart se sont des composés phénoliques qui possèdent au moins un noyau aromatique, contenant un ou plusieurs substituant, en effet cette propriété antioxydante est en relation directe avec la structure de ces molécules (Cosio et al., 2006).

Pour tester l'activité antioxydante de nos extraits, nous avons utilisé deux méthodes : test antioxydant par quantification spectrophotométrique par DPPH et test de la réduction du fer FRAP.

V.5.1 Pouvoir antioxydant par test de DPPH

Après révélation par le DPPH, la plus part des extraits et fractions ont montré des zones d'activités franches contre le DPPH de couleur jaune.

Les chromatogrammes des différents extraits révélés par une solution de DPPH, présentent quelques constituants à activité anti-radicalaire qui apparaissent sous forme de spots de couleur Jaune blanc selon la réaction suivante.

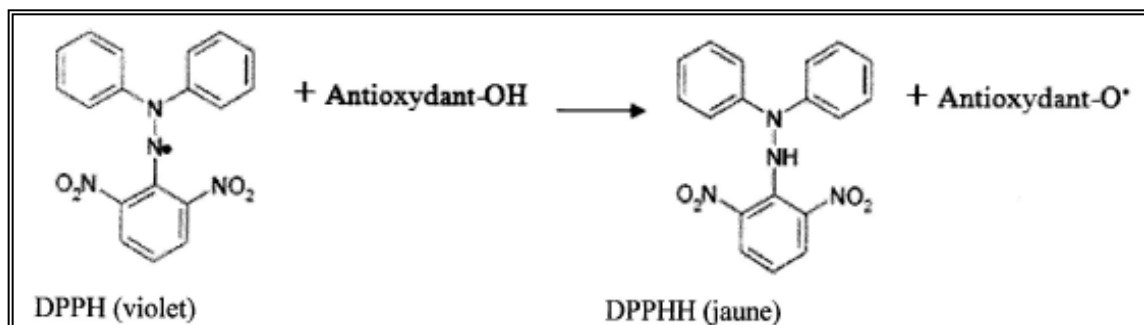


Figure V.26 : Réaction de piégeage des radicaux libres par DPPH.

Les méthodes utilisés pour évaluer la capacité antioxydante des extraits végétaux sont très diverses parmi lesquelles la méthode du radical 2,2-diphényl-1 picrylhydrazyle (DPPH), une méthode simple, rapide et largement utilisée. L'activité antioxydante des extraits et fractions d'*E.alata* et *A.halimus* se manifeste via le changement de la couleur du DPPH entre l'état oxydée (forme violette) et l'état réduit (forme jaune), ce qui a permis de quantifier le pourcentage d'inhibition de ce radical en mesurant les variations de l'absorbance aux différentes concentrations utilisées.

Pratiquement la plus part des extraits ont réagi positivement aux tests anti-radicalaires avec le DPPH, ceci s'explique par la présence d'un pouvoir antioxydant et la diminution de l'absorbance du radical DPPH est expliquée par sa réduction en présence des extraits des deux plantes.

Pour *E.alata*, a une concentration de 1mg/ml l'extrait aqueux donne le pourcentage d'inhibition le plus élevé (82,08%) suivi par l'extrait d'acétate d'éthyle (78,72%) puis l'extrait méthanolique (77,72%). La fraction aqueuse a présenté aussi un bon pouvoir antioxydant (74,57%) tandis que, l'extrait de flavonoïde a donné un pouvoir antioxydant plus au moins élevée représentée par (62,12%). La fraction acétate d'éthyle a le pouvoir le plus modéré avec (42,15%). Alors que l'extrait d'alcaloïdes et les fractions Hexane et chloroforme ont donné des pourcentages d'inhibitions qui ne dépasse pas 30% (figure V.27, V.28).

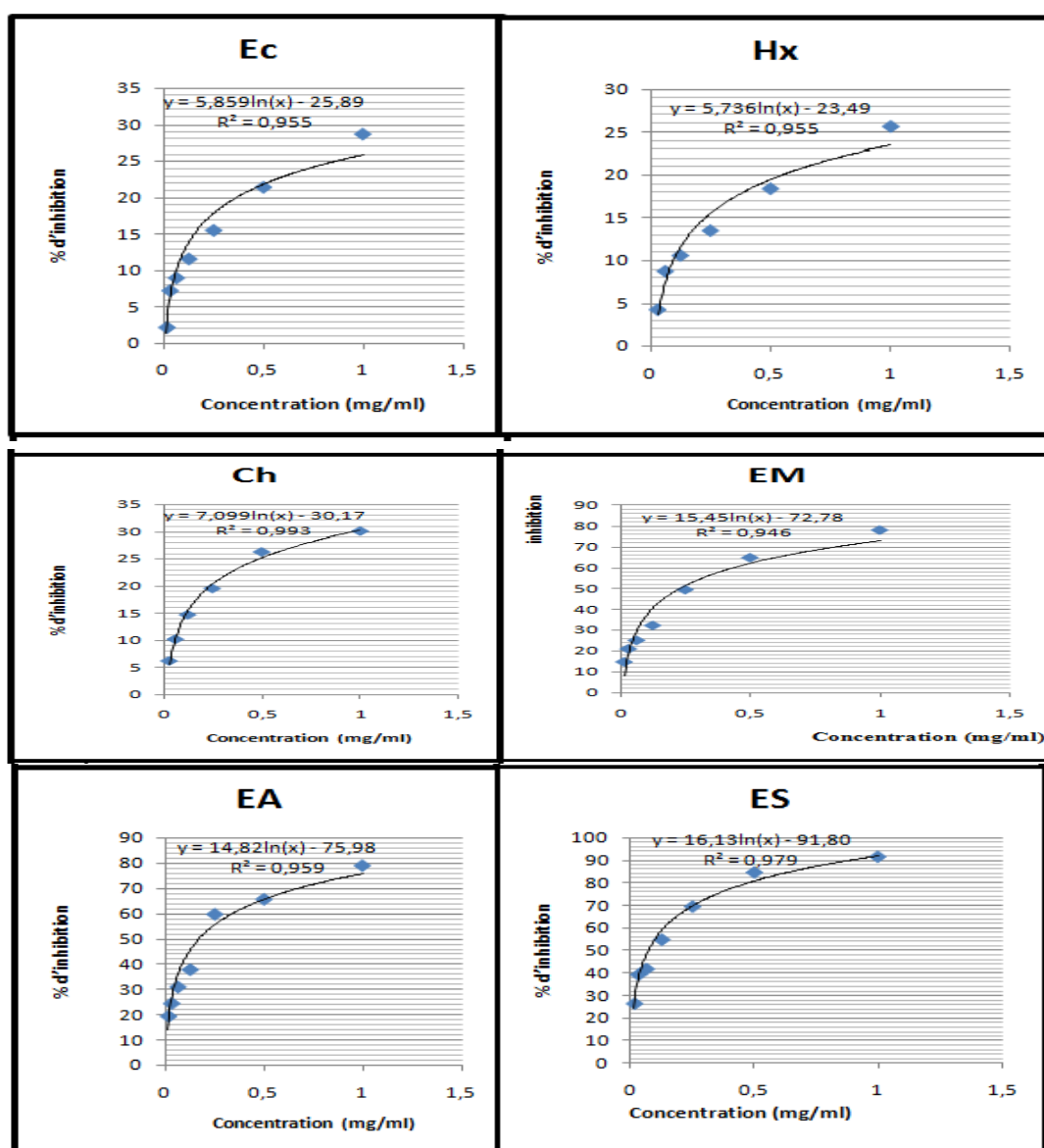


Figure V.27: Activité antioxydante des extraits et fractions d'*E.alata* et d'acide ascorbique, EM: extrait méthanolique, EA : extrait aqueux, EC : extrait alcaloïdes Hx: fraction hexane, Ch : fraction chloroforme et ES : acide ascorbique.

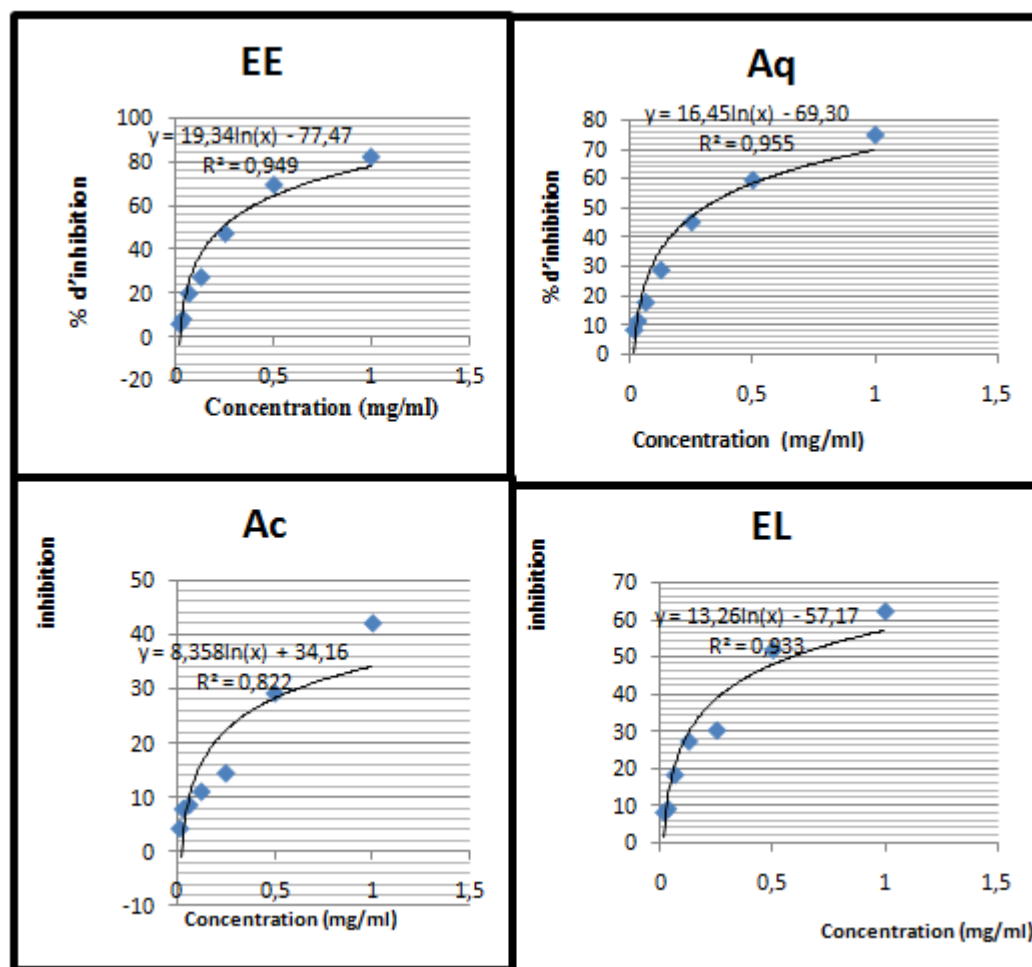


Figure V.28 : Activité antioxydante des extraits et fractions *d'E.alata*, EE : extrait acétate d'éthyle, Aq : fraction aqueuse, EL : extrait flavonoïdes et Ac : fraction acétate d'éthyle.

Pour *A.halimus* la fraction aqueuse a donné le pourcentage d'inhibition le plus élevé (76,39%) suivi par l'extrait des flavonoïdes (72,48%), l'extrait Aqueux (62,69%), l'extrait d'acétate d'éthyle (60,14%) puis l'extrait méthanolique (59,11%) à une concentration de 1 mg/ml (Figure V.29, V.30).

L'extrait des alcaloïdes et les fractions hexane, chloroforme et acétate d'éthyle ont donné des pouvoirs antioxydant qui ne dépassent pas 30% à une concentration de 1 mg/ml.

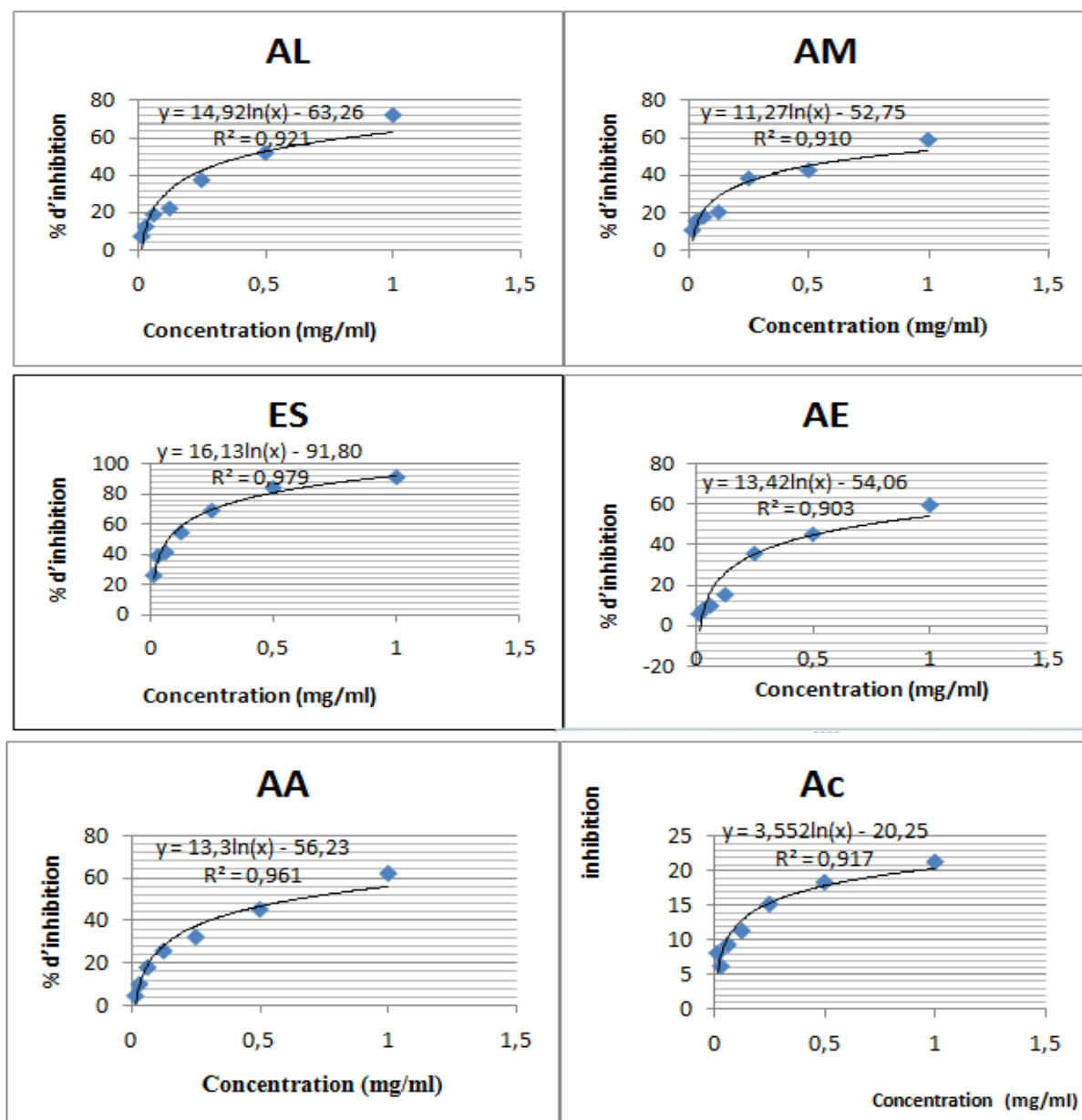


Figure V.29 : Activité antioxydante des extraits d'*A.halimus* et d'acide ascorbique, AM: extrait méthanolique, AA : extrait aqueux, AE : extrait acétate d'éthyle, AL : extrait flavonoïdes, AC : extrait alcaloïdes et ES : acide ascorbique.

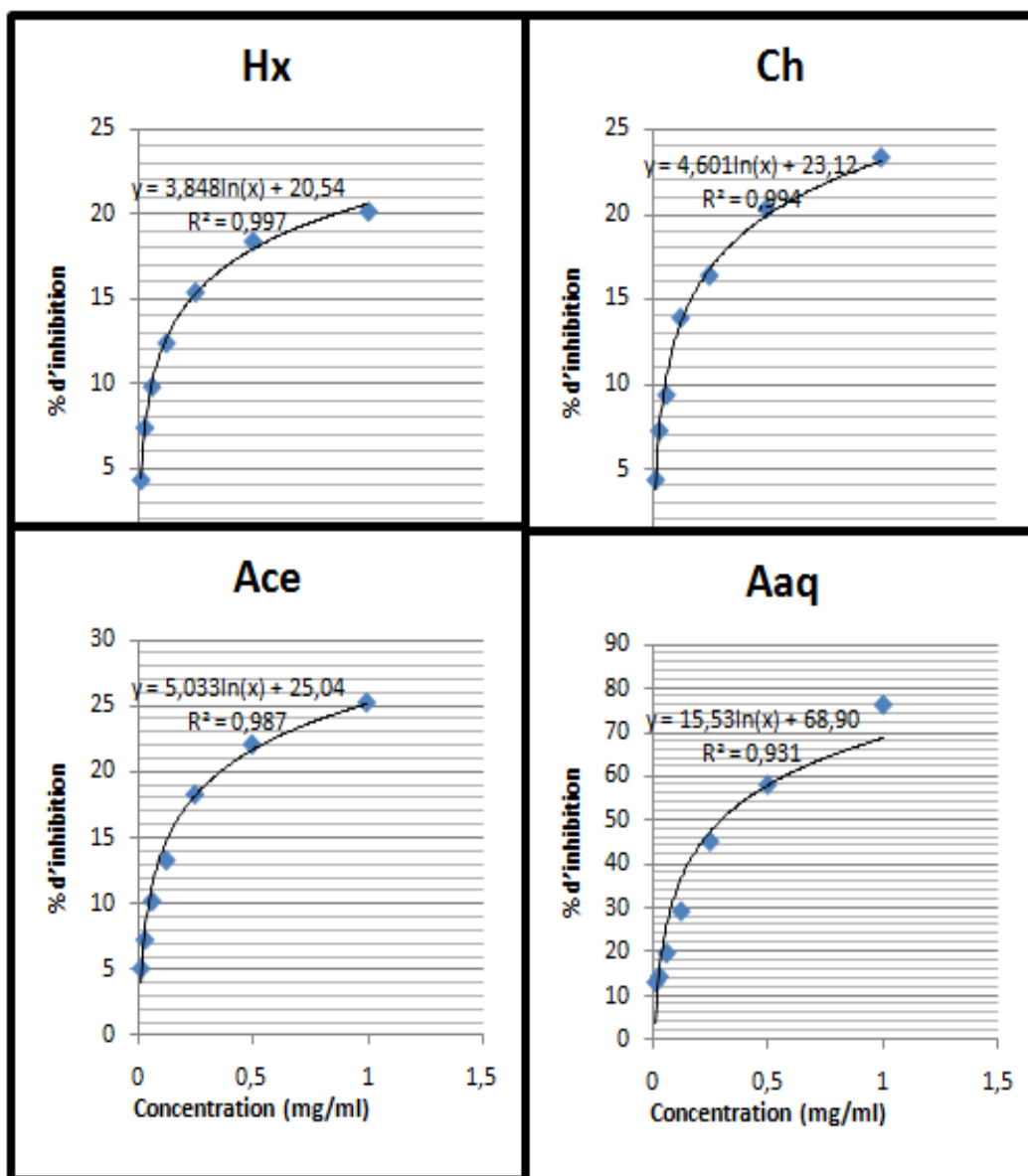


Figure V.30 : Activité antioxydante des fractions d'*A. halimus*, Hx: fraction hexane, Aaq : fraction aqueuse, Ch : fraction chloroforme et Ace : fraction acétate d'éthyle.

L'analyse des graphes a montré une augmentation proportionnelle entre le pourcentage d'inhibition et la concentration. Le pourcentage d'inhibition montre seulement la capacité de l'échantillon, à une concentration fixée, de réduire ou non les radicaux et dans beaucoup de cas, l'augmentation de la concentration de l'antioxydant amène l'augmentation de ces indices relatifs (Sanchez-Moreno, 1998).

Pour cela l'activité antioxydante des extraits est exprimée en CI50, ce paramètre a été employé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats (Ranga et al., 2009), il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de

l'activité du radical DPPH (Pokorny et al., 2001). Ces CI50 sont déterminées à partir des graphes dont l'abscisse représente la concentration de l'extrait et l'ordonnée l'activité antioxydante en pourcentage.

Pour certains extraits, nous avons pu calculer la CI50 (Tableau V.9, V.10), mais pour d'autres, il a été impossible de déterminer ce paramètre dans ce type de conditions expérimentales, comme les fractions hexane, les fractions chloroforme et les fractions d'acétate d'éthyle qui ont présenté l'état de plateau à un pourcentage inférieur à 50% d'inhibition.

Les valeurs des CI50 trouvées pour tous les extraits et fractions testés sont représentées dans les tableaux V.9 et V.10.

Tableau V.9 : valeurs des CI50 des extraits d'*E.alata*.

Extrait	CI50 (mg/ml)
EM	0,56 ± 0,93
EE	0,49 ± 1,34
EA	0,42 ± 0,97
Aq	0,61 ± 1,53
EL	0,64 ± 2,12
Ac	0,73 ± 1,08
ES	0,13 ± 0,53

EM: extrait méthanolique, EE : extrait acétate d'éthyle, EA : extrait aqueux, Aq : fraction aqueuse, EL : extrait flavonoïdes, AC : extrait alcaloïdes et ES : acide ascorbique.

Tableau V.10 : valeurs des CI50 des extraits d'*A.halimus*.

Extrait	CI50
AA	0,67 ± 1,63
AM	0,78 ± 1,01
AE	0,76 ± 1,85
AL	0,59 ± 1,33
Aaq	0,53 ± 1,16
ES	0,13 ± 0,53

AA : extrait aqueux, AM: extrait méthanolique, AE : extrait acétate d'éthyle, AL : extrait flavonoïdes, Aaq : fraction aqueuse, ES : acide ascorbique.

La valeur d'CI50 de l'acide ascorbique que nous avons trouvé ($0,13 \pm 0,53$ mg/ml) a été proche à celle trouvée par Benhammou et al, (2009). (De l'ordre de 0,11 mg/ml). Elle a été de 0,73 mg/ml avec la fraction acétate d'éthyle d'*Ephedra*, $0,42 \pm 0,97$ et $0,67 \pm 1,63$ mg/ml pour les extraits aqueux, $0,49 \pm 1,34$ et $0,76 \pm 1,85$ mg/ml pour les extraits d'acétate d'éthyle, $0,56 \pm 0,93$ et $0,78 \pm 1,01$ mg/ml avec les extraits méthanoliques, $0,64 \pm 2,12$ et $0,59 \pm 1,33$ mg/ml avec les extraits des alcaloïdes, $0,61 \pm 1,53$ et $0,53 \pm 1,16$ mg/ml avec les fractions aqueuses pour *Ephedra* et *Atriplex* respectivement.

Nos résultats ne concordent pas avec les résultats trouvés par Jaradat et al (2021), qui a travaillé sur *E. alata* et qui a rapporté que la fraction méthanolique, a le meilleur pourcentage d'inhibition avec CI50 de $1,70$ µg/ml et la fraction acétone, a montré une valeur CI50 de $5,00$ µg/ml. Au contraire, la fraction aqueuse n'a montré qu'une activité antioxydante modérée, avec une valeur de CI50 de $15,5$ µg/ml.

V.5.3. Test de la réduction du fer FRAP (Ferricreducing-antioxidant power)

L'activité anti oxydante des extraits de deux plantes a été évaluée en utilisant la méthode FRAP. Cette dernière est un essai simple, rapide et reproductible (Li et al, 2008).

La présence des réductants dans les extraits provoque la réduction de fer Fe^{3+} complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent, Fe^{2+} peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu vert dans le milieu réactionnel à 700 nm. En d'autre terme, le système $FeCl_3/K_3Fe(CN)_6$ confère à la méthode la sensibilité pour la détermination « semi quantitative » des concentrations des polyphénols, qui participent à la réaction redox (Amarowicz et al, 2004).

D'après nos résultats, pour les extraits et fractions de deux plantes testés, l'augmentation de la réduction du fer a été proportionnelle aux concentrations utilisées.

Les résultats obtenus pour cette méthode ont été présentés sous forme de graphes de l'absorbance en fonction des concentrations des extraits et fractions ou de l'acide ascorbique utilisé comme molécule de référence (figures V.31, V.32, V.33, V. 34, V. 35, V.36).

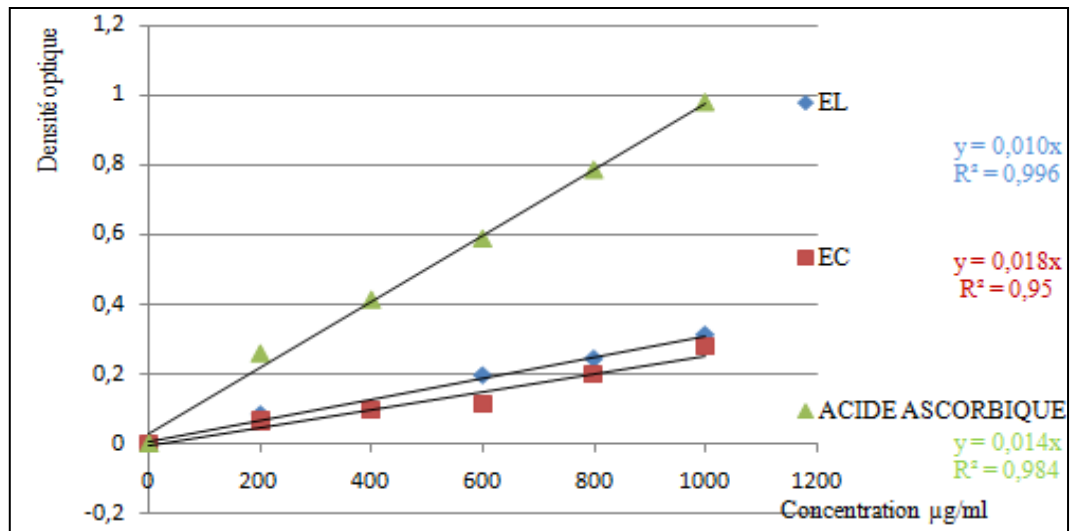


Figure V.31 : Pouvoir réducteur des extraits d'*E. alata* et de l'acide ascorbique, EC : extrait alcaloïdes et EL : extrait flavonoïdes.

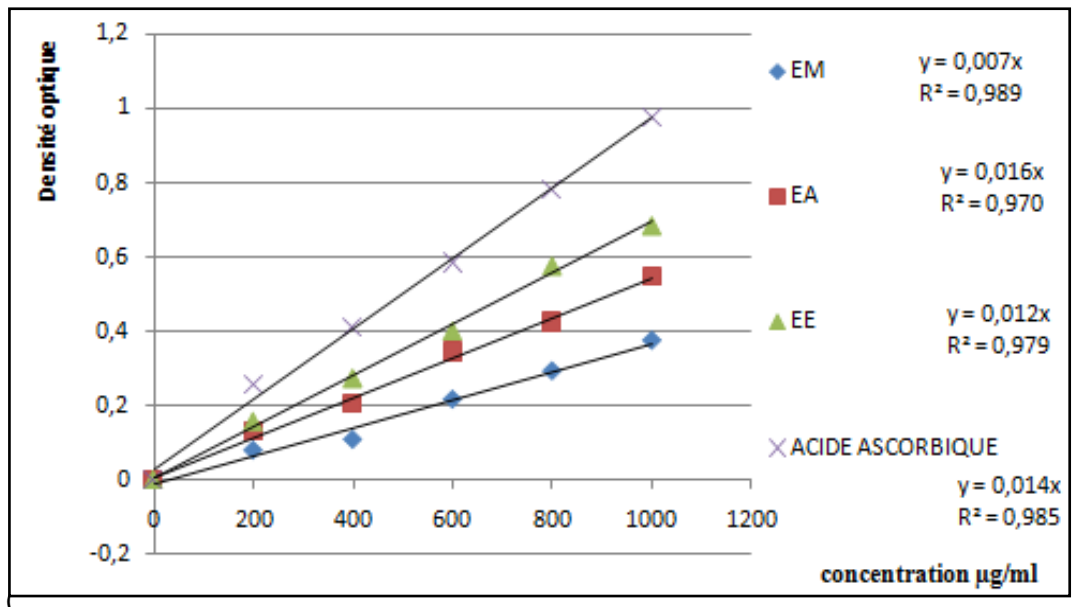


Figure V.32 : Pouvoir réducteur des extraits d'*E. alata* et de l'acide ascorbique, EM: extrait méthanolique, EA : extrait aqueux, EE : extrait acétate d'éthyle.

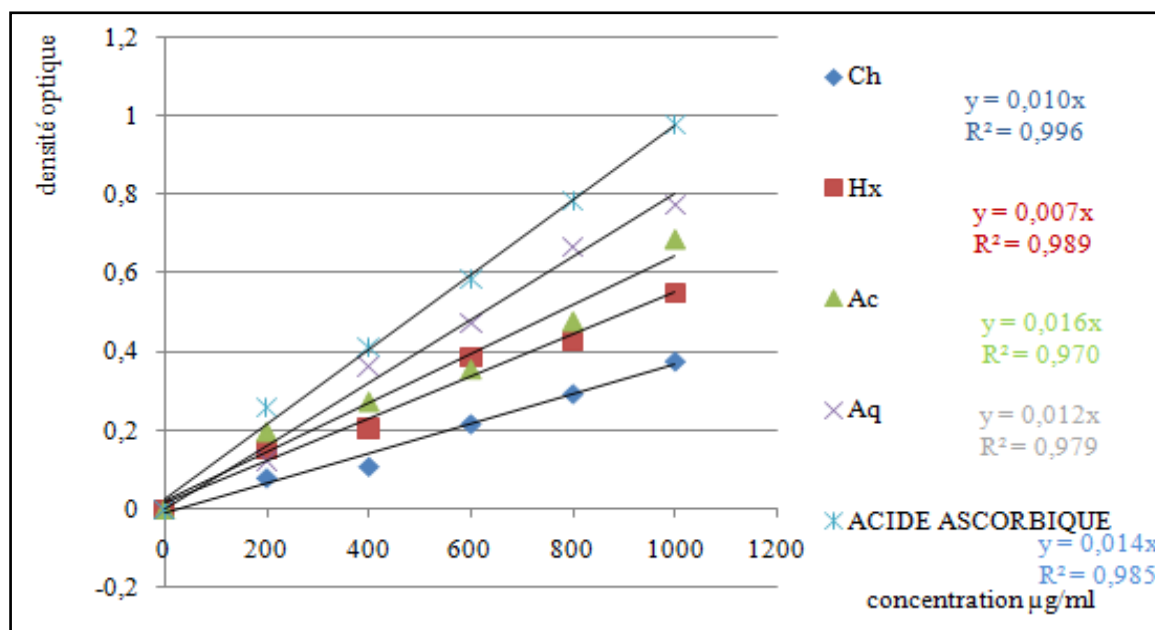


Figure V.33 : Pouvoir réducteur des fractions d'*E.alata* et de l'acide ascorbique, Hx: fraction hexane, Ch : fraction chloroforme, Aq : fraction aqueuse et Ac : fraction acétate d'éthyle.

D'après les figures, nous avons remarqué qu'à une concentration de 400µg/ml, les extraits EM, EA, EE, EL et EC ont présenté des densités optiques de 0,1/0,27/0,2/0,1 et 0,12 respectivement. Lorsqu'on augmente la concentration, les absorbances augmentent. À une concentration finale de 1000 µg/ml, les extraits ont présenté une densité optique maximale égale à 0,37/0,68/0,54/0,31 et 0,34 respectivement. Alors que l'acide ascorbique a présenté une DO de 0,97 à la même concentration. Nous avons pu noter que l'extrait EE a présenté l'activité la plus élevée pour réduire le fer par rapport aux autres extraits, mais inférieure à celle de l'acide ascorbique.

Pour les fractions les DO ont été comme suit : 0,37/ 0,54/ 0,68 et 0,77 pour Ch, Hx, Ac et Aq respectivement à la concentration de 1000µg/ml.

Pour les extraits d'*Atriplex*, l'extrait AA a été le plus actif suivi par l'extrait AE, tandis que l'extrait AM a été le moins actif. D'autre part, les extraits et fractions d'*Atriplex* ont montrés un pouvoir de réduction du fer moins important que celui démontré par les extraits d'*Ephedra*.

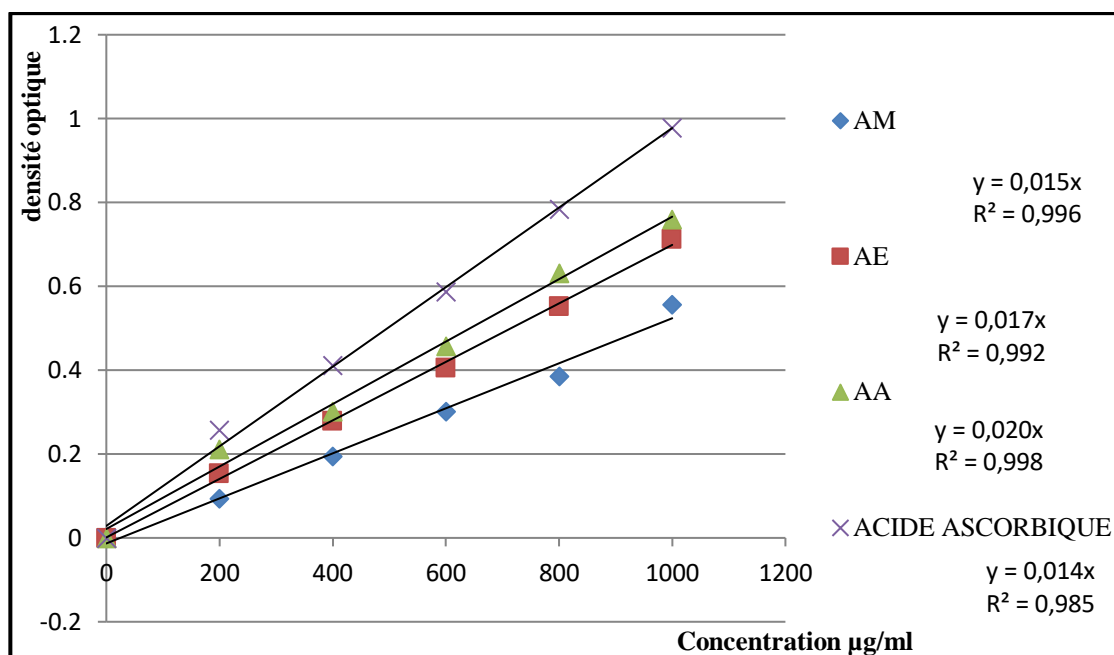


Figure V.34: Pouvoir réducteur des extraits d'*A.halimus* et de l'acide ascorbique. AM: extrait méthanolique, AA : extrait aqueux, AE : extrait acétate d'éthyle.

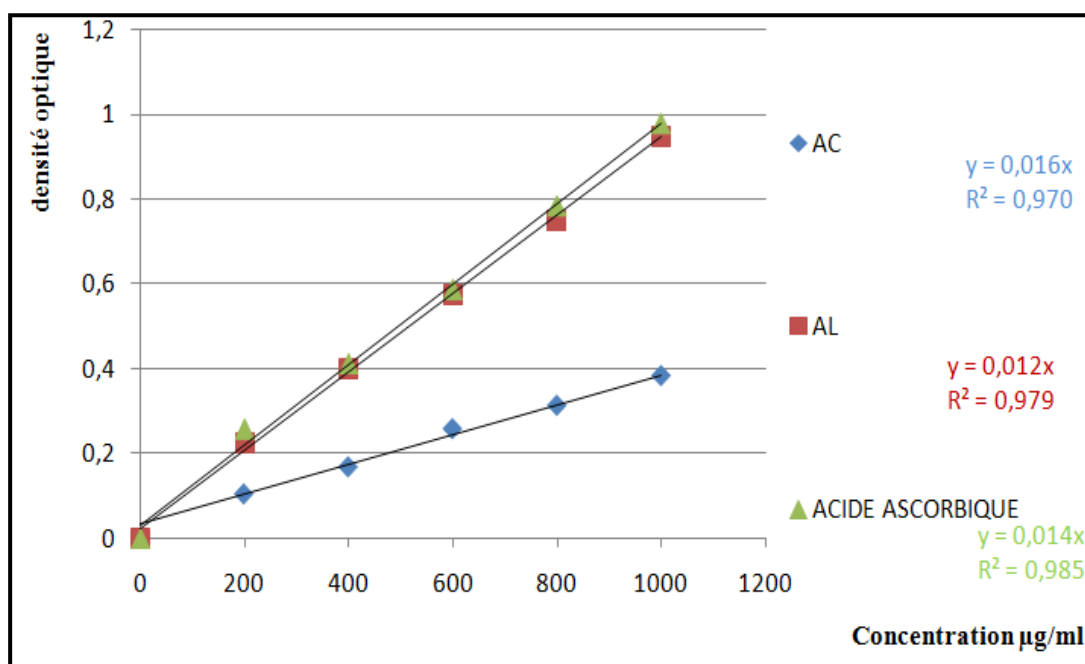


Figure V.35: Pouvoir réducteur des extraits d'*A.halimus* et de l'acide ascorbique. AL : extrait flavonoïdes et AC : extrait alcaloïdes

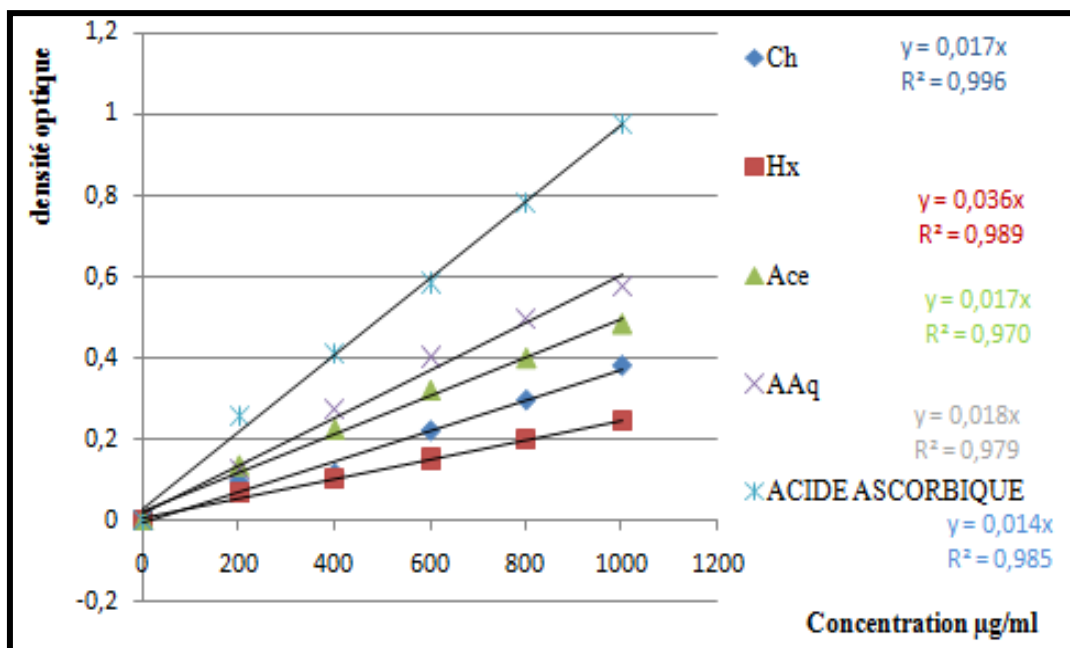


Figure V.36 : Pouvoir réducteur des fractions d'*A.halimus* et de l'acide ascorbique, Hx: fraction hexane, AAq : fraction aqueuse, Ch : fraction chloroforme et Ace : fraction acétate d'éthyle.

Nous avons constaté que la pouvoir de réduction du fer est proportionnel à l'augmentation des concentrations des extraits et fractions. La concentration efficace à réduire 50% du fer, IC₅₀ de l'acide ascorbique et des différents extraits et fractions testées a été calculée à partir des courbes (V.31, V.32, V.33, V. 34, V. 35 et V.36).

Les figures 37 et 38 ont résumé les valeurs d'IC₅₀ pour chaque échantillon en comparaison avec celle de l'acide ascorbique.

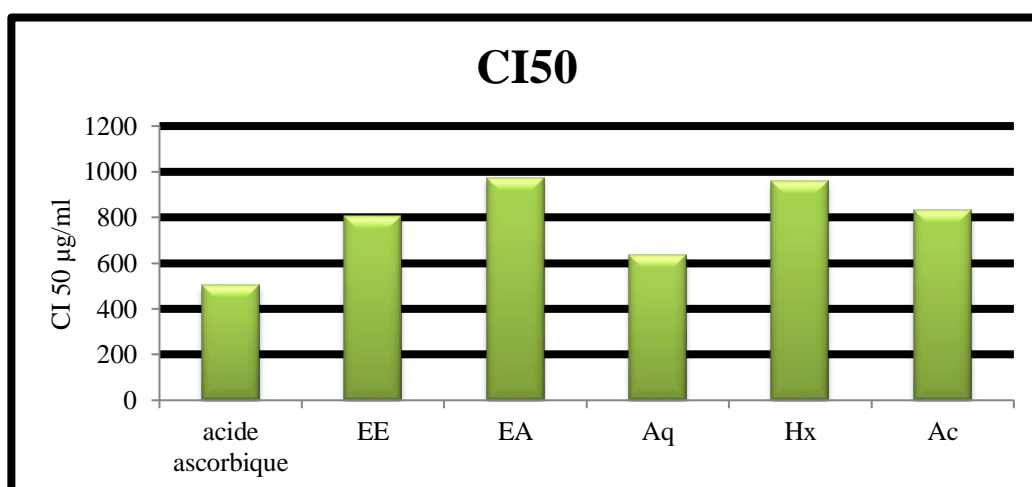


Figure V.37 : Les valeurs d'IC₅₀ des extraits et fraction d'*E.alata*. EA : extrait aqueux, EE : extrait acétate d'éthyle, Hx: fraction hexane, Aq : fraction aqueuse et Ac : fraction acétate d'éthyle.

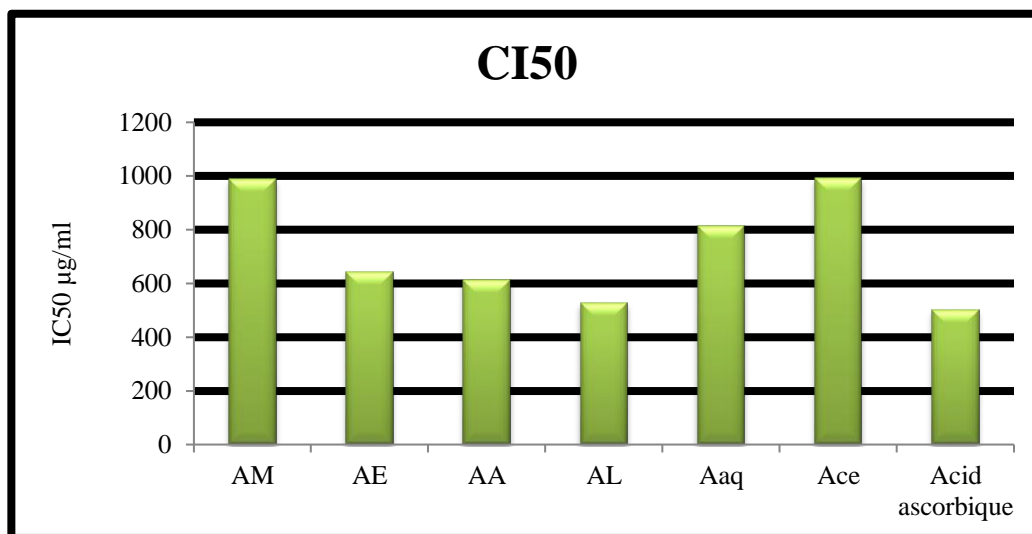


Figure V.38 : Les valeurs d'IC50 des extraits et fraction d'*A.halimus*. AM: extrait méthanolique, AA : extrait aqueux, AE : extrait acétate d'éthyle, AL : extrait flavonoïdes Aaq : fraction aqueuse, et Ace : fraction acétate d'éthyle.

Nous avons remarqué que les valeurs d'IC50 des différents échantillons d'*A.halimus* ont varié de $528 \pm 0,004$ à $987 \pm 0,002$ µg/ml. Le pouvoir réducteur du fer le plus élevé a été observé par l'extrait flavonoïdes (IC50 = $528 \pm 0,004$ µg/ml) qui est relativement proche de celui de l'acide ascorbique (IC50 = $502 \pm 0,001$ µg/ml). Tandis que les valeurs d'IC50 des extraits et fractions d'*E.alata* ont varié de $637 \pm 0,003$ à $960 \pm 0,002$ µg/ml et Le pouvoir réducteur le plus élevé a été observé par la fraction aqueuse (IC50 = $637 \pm 0,003$ µg/ml).

La variation de l'activité antioxydante des échantillons est peut être attribué aux origines botanique, la présence d'agents antioxydants, tels que les flavonoïdes et les acides phénoliques (la qualité et la quantité des composés phénolique qui peut être affectée par de nombreux facteurs, sa structure et en particulier les degrés et la position des groupements hydroxyle sur le noyau aromatique de la molécule.

Le pouvoir réducteur des extraits et fractions est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants (Bougandoura et Bendimerad, 2012).

V.6 Activité antidiabétique

L'activité antidiabétique a été réalisée dans le laboratoire : Antibiotiques Antifongiques: Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique de l'université de tlemcen.

Les extraits et les fractions de deux plantes *E.alata* et *A. halimus* ont été évalués pour leur activité antidiabétique testée *in vitro* par les méthodes d'inhibition enzymatique : α amylase et α -glucosidase.

V.6.1 Alpha-amylase

Dans cette étude, l'acarbose agent inhibiteur de l' α amylase est utilisé comme contrôle positif. Il inhibe fortement l'activité α amylasique lorsque comparée aux extraits de plantes. À une concentration de 300 $\mu\text{g/ml}$ il atteint un taux d'inhibition de 98% et son CI50 est évalué à $25,89 \pm 0,24 \mu\text{g/ml}$.

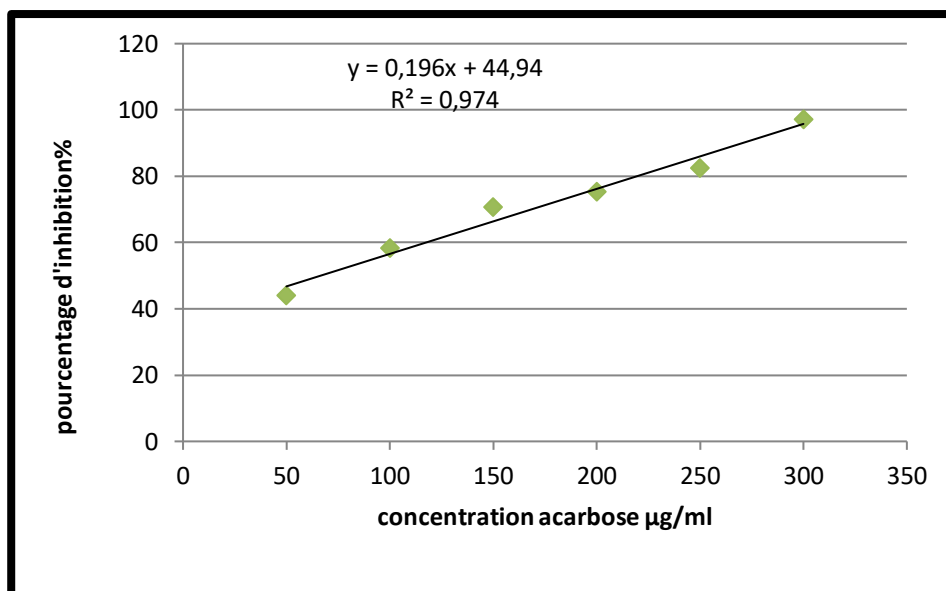


Figure V.39 : Pourcentages d'inhibition de l'enzyme α -amylase en fonction des différentes concentrations d'acarbose.

Les extraits et les fractions préparés à partir des deux plantes semblent exercer *in vitro* un effet inhibiteur variable dose-dépendant sur l'activité de l' α -amylase comme montre les figures V.40, V. 41, V. 42, V. 43.

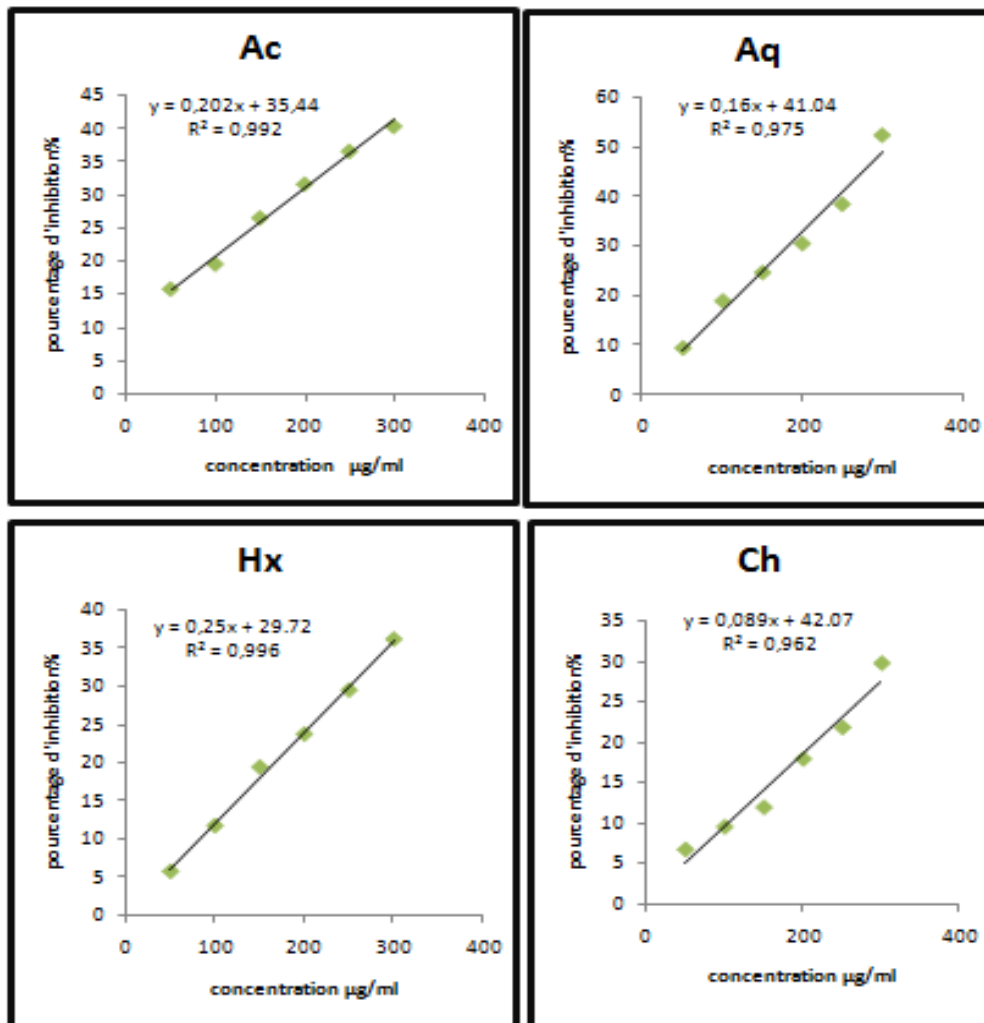


Figure V.40 : Pourcentages d'inhibition de l'enzyme α -amylase en fonction des différentes concentrations des fractions d'*E. alata*. Hx: fraction hexane, Aq : fraction aqueuse, Ch : fraction chloroforme et Ac : fraction acétate d'éthyle.

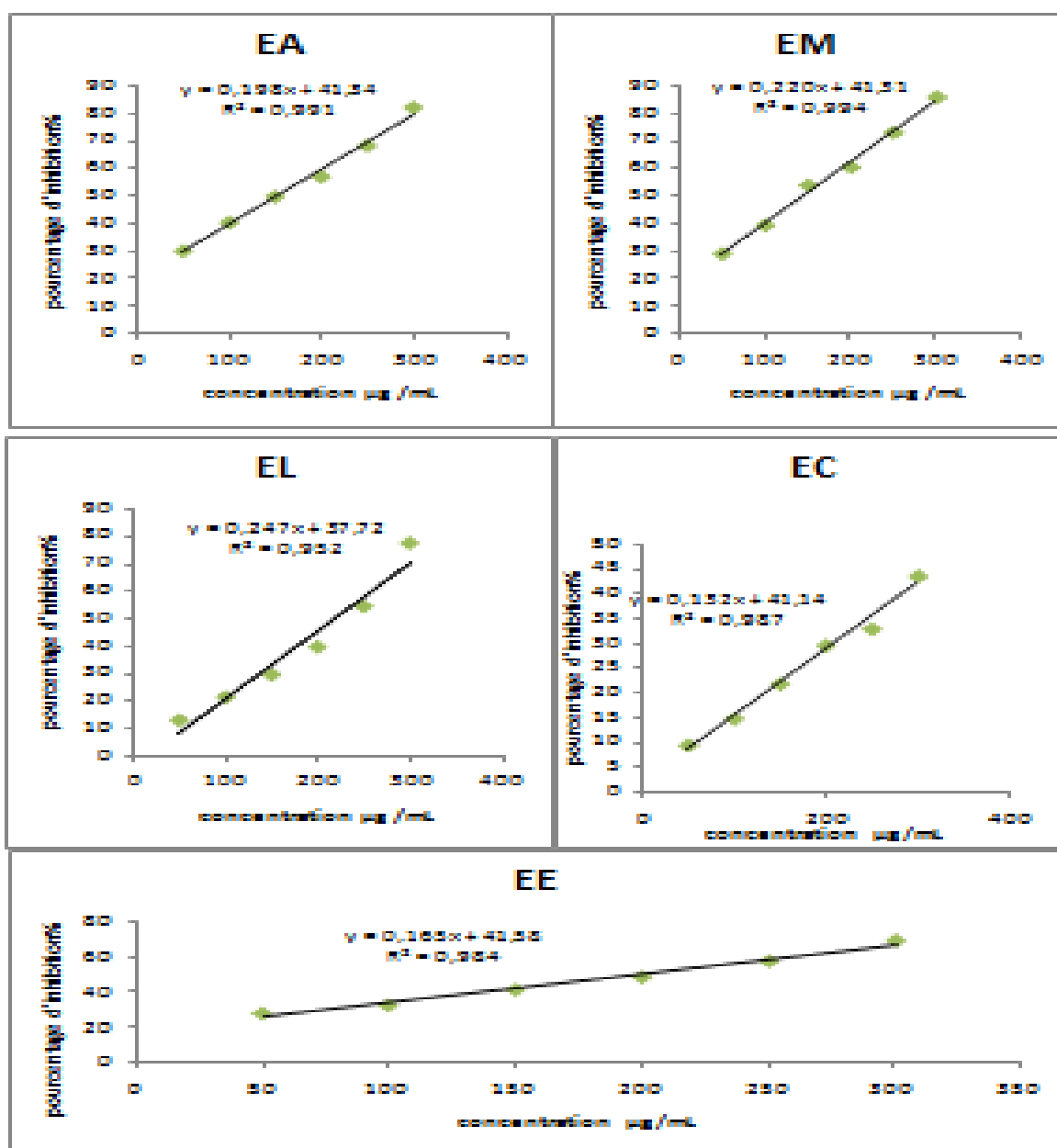


Figure V.41 : Pourcentages d'inhibition de l'enzyme α -amylase en fonction des différentes concentrations des extraits d'*E. alata*. EM: extrait méthanolique, EA : extrait aqueux, EE : extrait acétate d'éthyle, EL : extrait flavonoïdes, EC : extrait alcaloïdes.

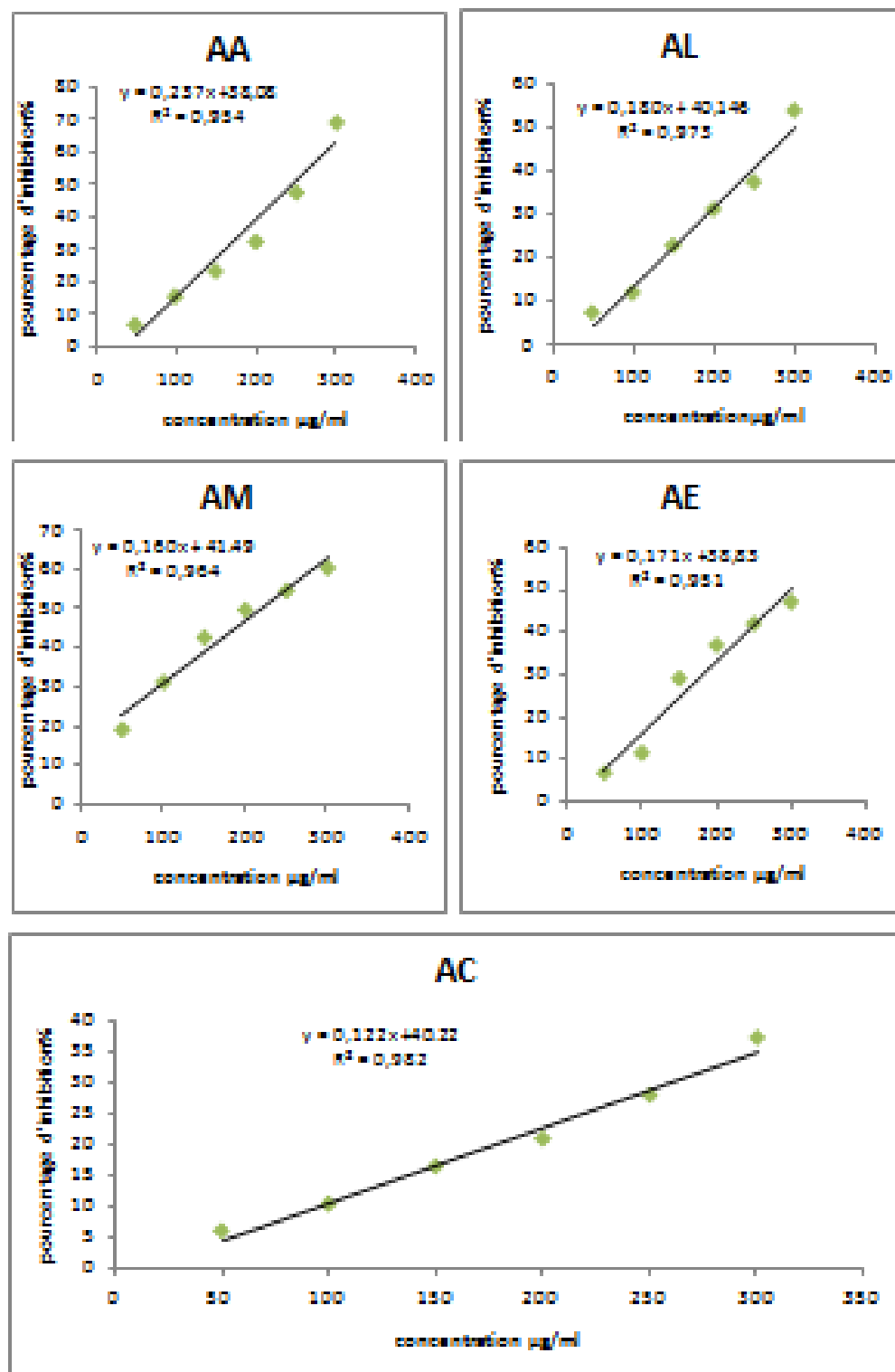


Figure V.42 : Pourcentages d'inhibition de l'enzyme α -amylase en fonction des différentes concentrations des extraits d'*A. halimus*. AM: extrait méthanolique, AA : extrait aqueux, AE : extrait acétate d'éthyle, AL : extrait flavonoïdes, AC : extrait alcaloïdes.

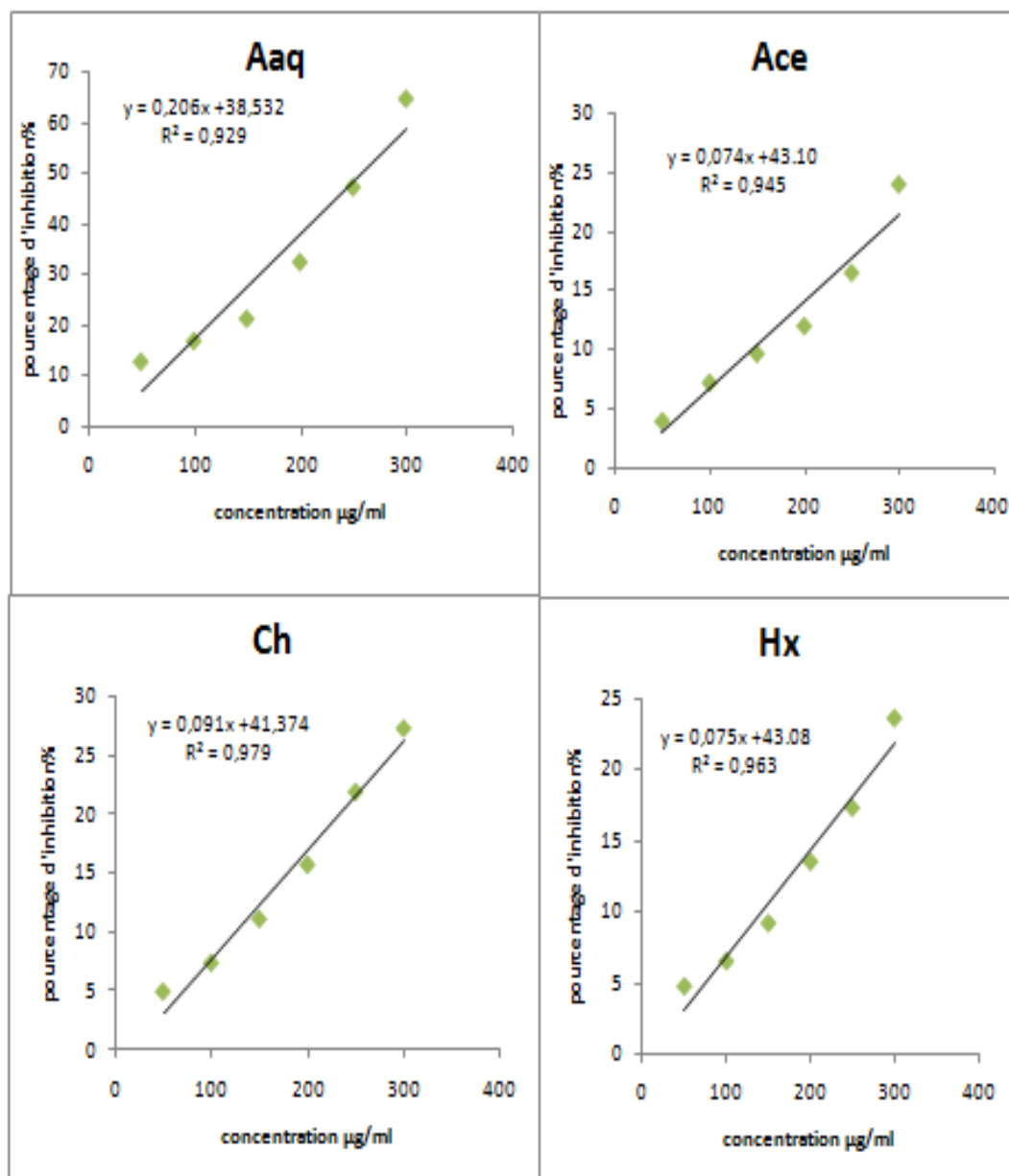


Figure V.43 : Pourcentages d'inhibition de l'enzyme α -amylase en fonction des différentes concentrations des fractions d'*A. halimus*. Hx: fraction hexane, Aaq : fraction aqueuse, Ch : fraction chloroforme et Ace : fraction acétate d'éthyle.

L'extrait méthanolique et aqueux d'*E. alata* et l'extrait aqueux d'*A. halimus* ont montré les meilleurs résultats d'inhibition enzymatique α -amylase à une concentration de 300 $\mu\text{g/ml}$ ils présentent un pourcentage d'inhibition de 85,32; 81,56 et 69,44 $\mu\text{g/ml}$ respectivement.

Nous avons calculé la concentration inhibitrice à 50% à partir des équations des courbes (Figure V.40, V. 41, V.42, V.43). Les résultats obtenus ont représenté par la figure (V.44 et V.45)

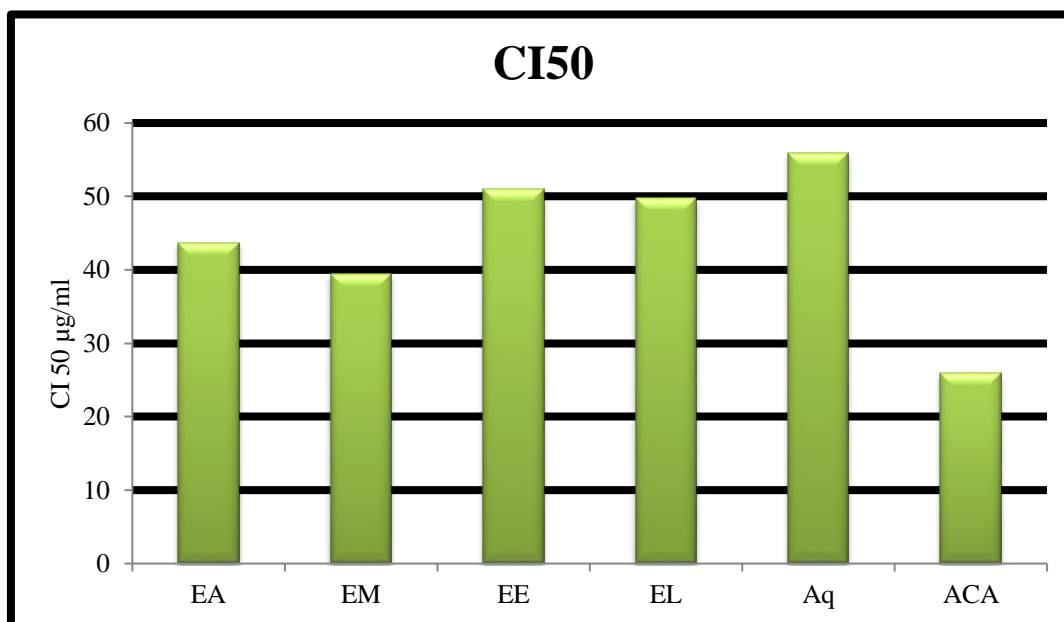


Figure V.44 : Valeurs des CI50 de l'inhibition de l'enzyme α -amylase par les extraits et fractions d'*E. alata* en comparaison avec l'acarbose. ACA : acarbose, EM: extrait méthanolique, EA : extrait aqueux, EE : extrait acétate d'éthyle, EL : extrait flavonoïdes et Aq : fraction aqueuse. Valeurs exprimées en moyenne \pm ESM (n = 3).

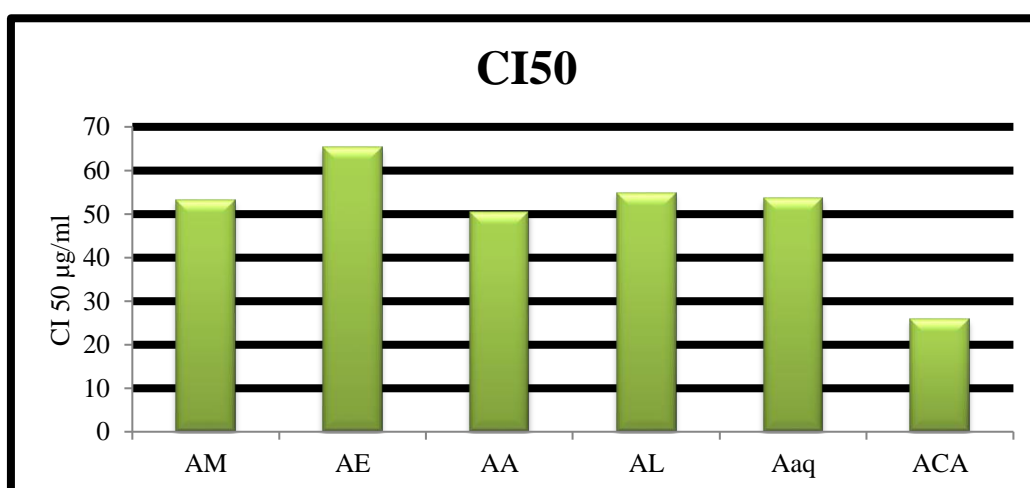


Figure V.45 : Valeurs des CI50 de l'inhibition de l'enzyme α -amylase par les extraits et fractions d'*A. halimus* en comparaison avec l'acarbose. ACA : acarbose, AM: extrait méthanolique, AA : extrait aqueux, AE : extrait acétate d'éthyle, AL : extrait flavonoïdes, Aaq : fraction aqueuse. Valeurs exprimées en moyenne \pm ESM (n = 3).

L'extrait méthanolique (CI50 = 39, 47 ± 1,32 µg/ml) et aqueux (CI50 = 43,69 ± 0,87 µg/ml) d'*E.alata* et l'extrait aqueux d'*A. halimus* (CI50 = 53,18 ± 0,75 µg/ml) ont montré les meilleurs résultats d'inhibition enzymatique α -amylase.

V.6.2 Alpha-glucosidase

La figure V.46 a montré les pourcentages d'inhibition de l'enzyme α -glucosidase en fonction des différentes concentrations d'acarbose. Les résultats des pourcentages d'inhibition enzymatique α -glucosidase par les différents extraits et fractions d'*E.alata* et *A.halimus* ont été représentés par les figures V.47, V.48, V.49, V.50.

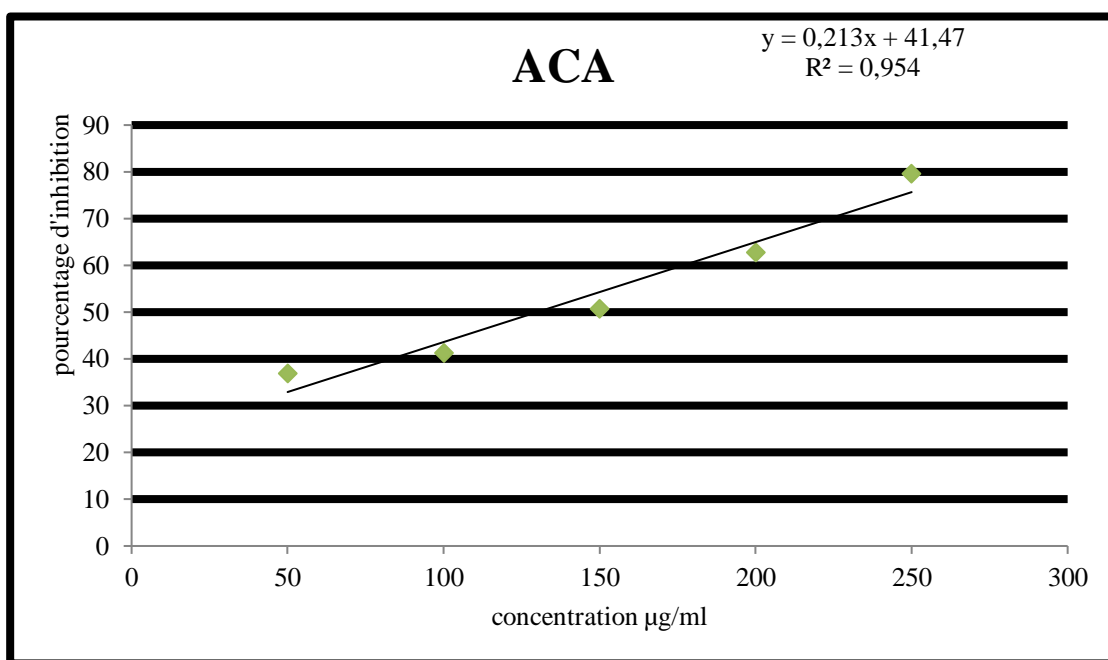


Figure V.46 : Pourcentages d'inhibition de l'enzyme α -glucosidase en fonction des différentes concentrations d'acarbose.

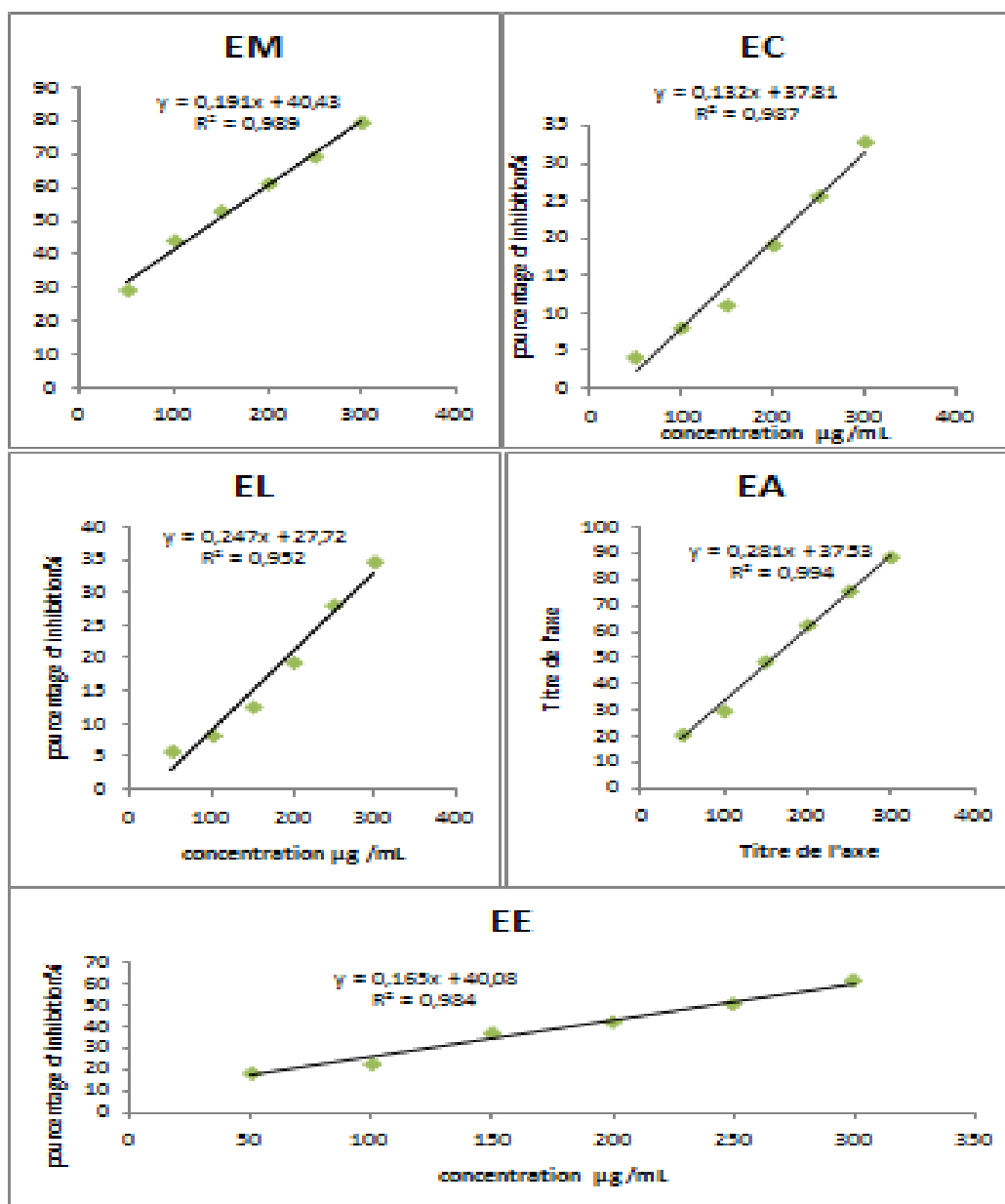


Figure V.47 : Pourcentages d'inhibition de l'enzyme α -glucosidase en fonction des différentes concentrations des extraits d'*E. alata*. EM: extrait méthanolique, EA : extrait aqueux, EE : extrait acétate d'éthyle, EL : extrait flavonoïdes, EC : extrait alcaloïdes.

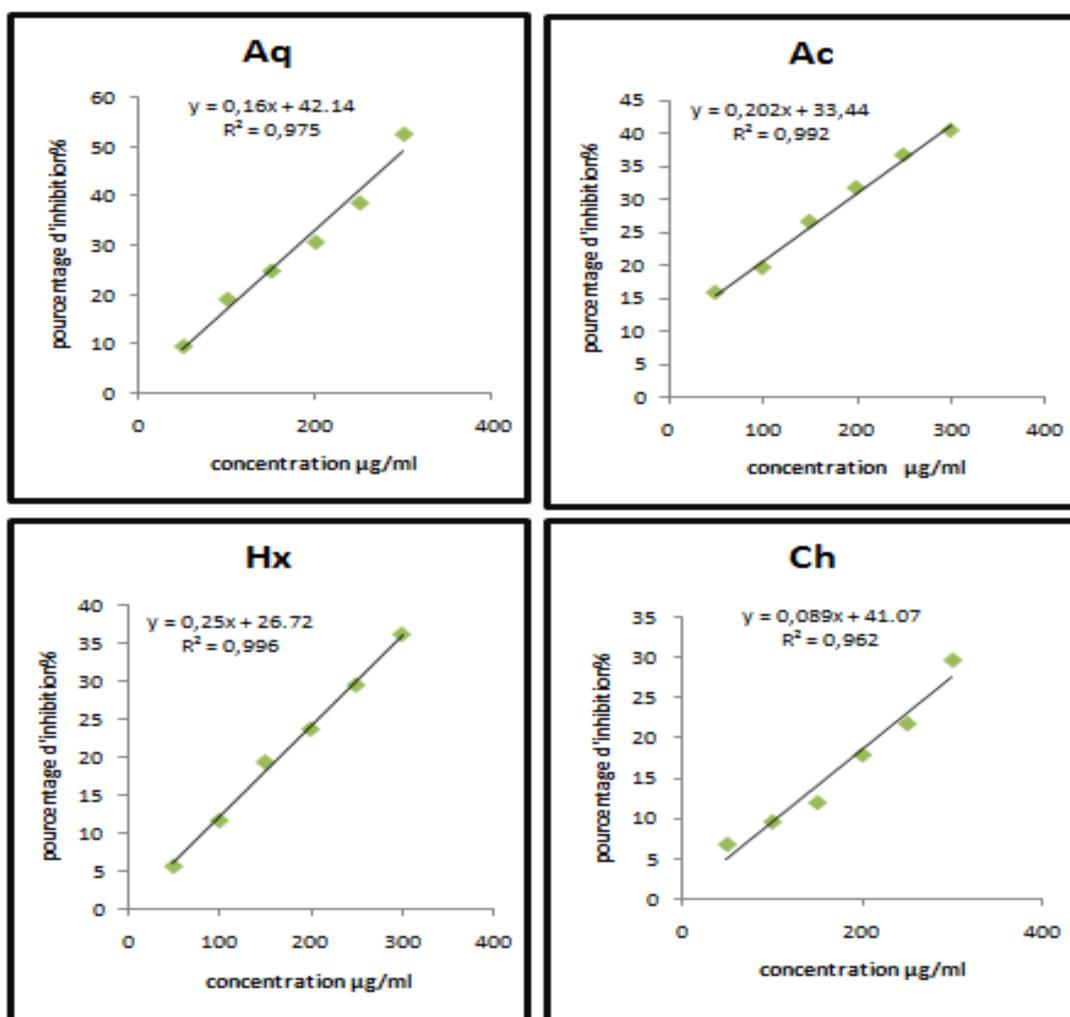


Figure V.48 : Pourcentages d'inhibition de l'enzyme α -glucosidase en fonction des différentes concentrations des fractions d'*E. alata*. Hx : fraction hexane, Aq : fraction aqueuse, Ch : fraction chloroforme et Ac : fraction acétate d'éthyle.

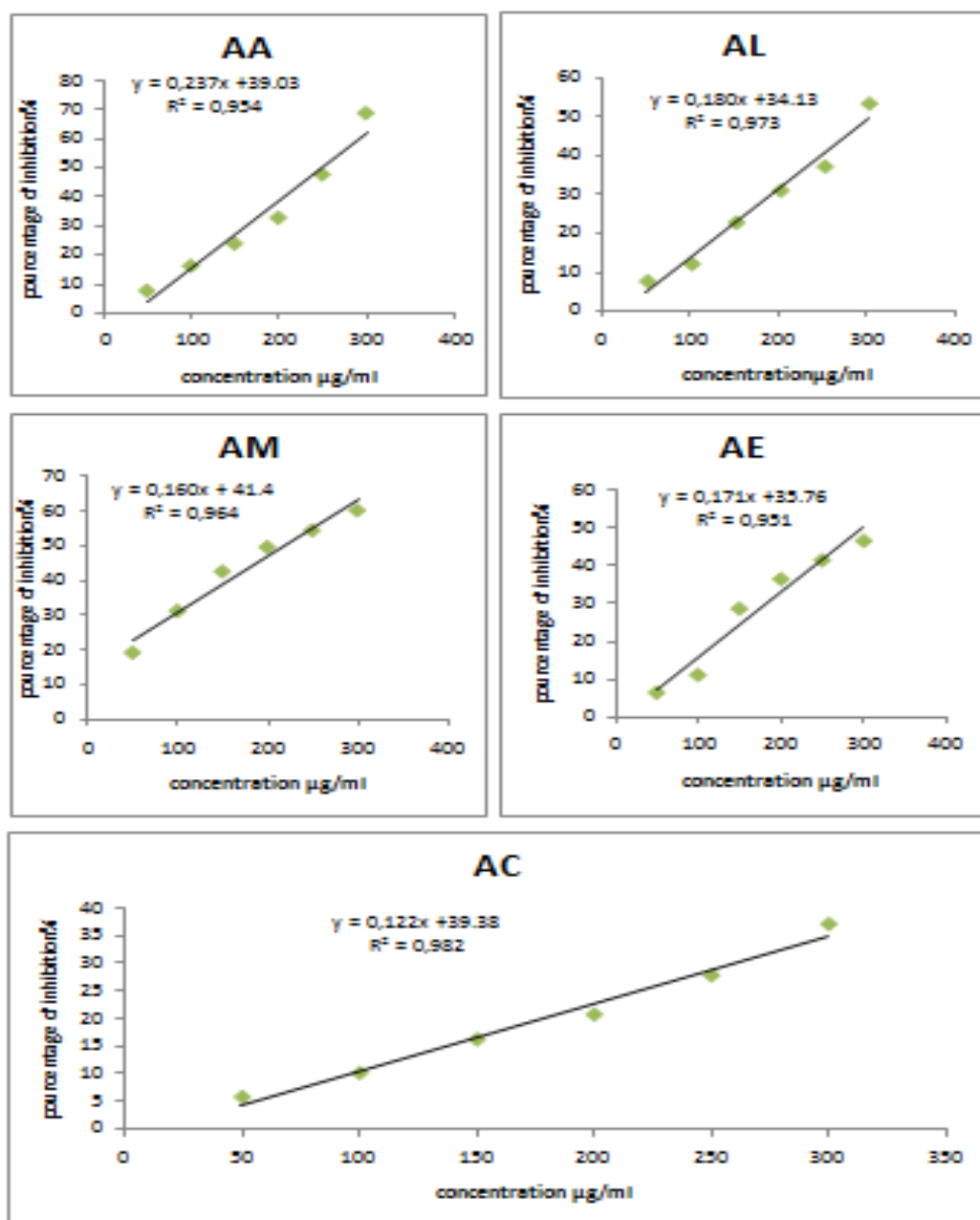


Figure V.49 : Pourcentages d'inhibition de l'enzyme α -glucosidase en fonction des différentes concentrations des extraits d'*A. halimus*. AM: extrait méthanolique, AA : extrait aqueux, AE : extrait acétate d'éthyle, AL : extrait flavonoïdes, AC : extrait alcaloïdes.

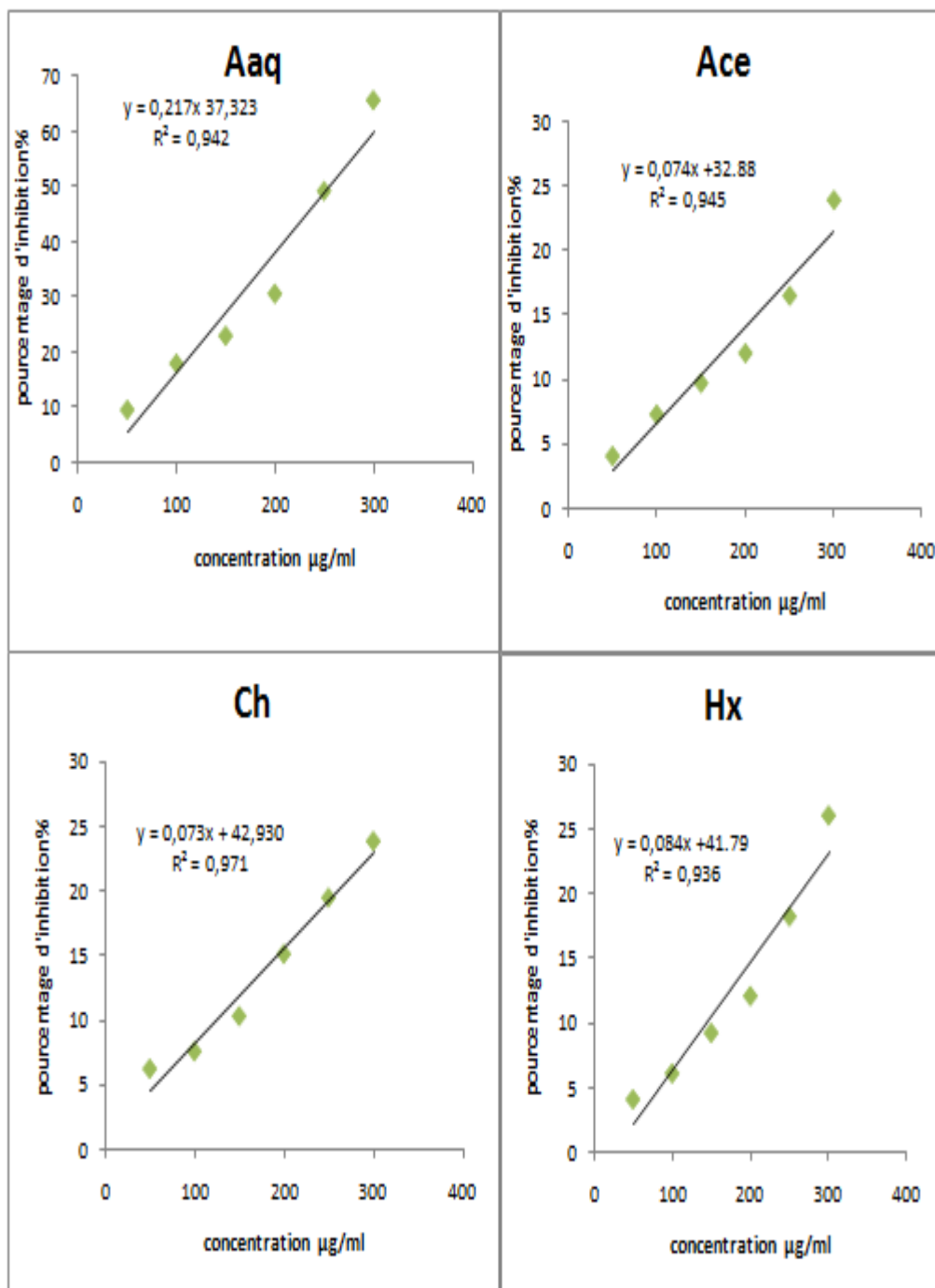


Figure V.50: Pourcentages d'inhibition de l'enzyme α -glucosidase en fonction des différentes concentrations des fractions d'*A. halimus*. Hx: fraction hexane, Aaq : fraction aqueuse, Ch : fraction chloroforme et Ace : fraction acétate d'éthyle.

Nous avons calculé la concentration inhibitrice à 50% à partir des équations des courbes (Figure V.47, V. 48, V.49, V.50). Les résultats obtenus ont représenté par la figure (V.51 et V.52)

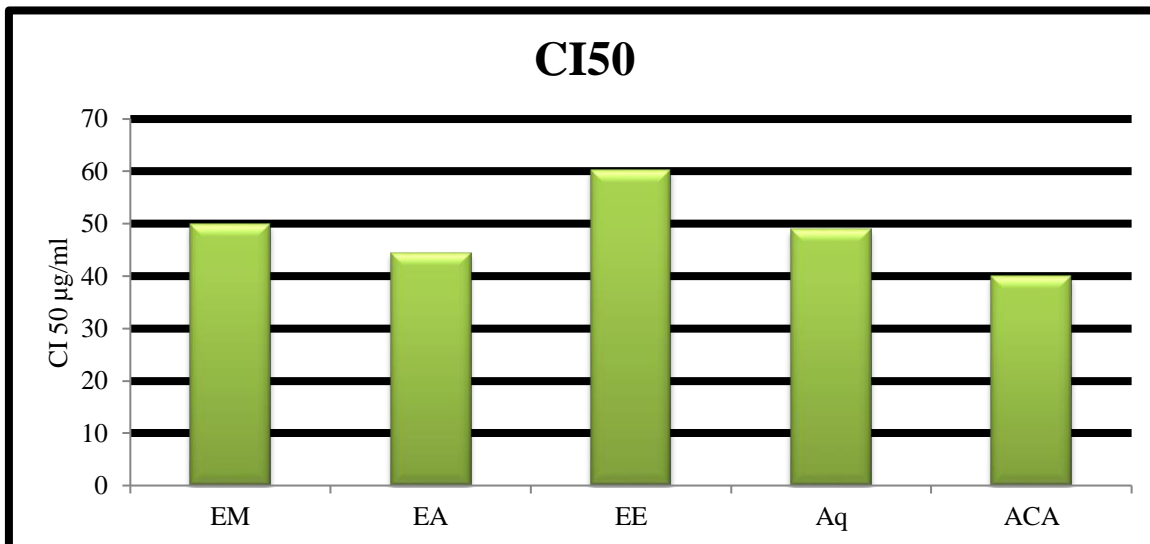


Figure V.51 : Valeurs des CI50 de l'inhibition de l'enzyme α -glucosidase par les extraits et fractions d'*E. alata* en comparaison avec l'acarbose. ACA : acarbose, EM: extrait méthanolique, EA : extrait aqueux, EE : extrait acétate d'éthyle, et Aq : fraction aqueuse. Valeurs exprimées en moyenne \pm ESM (n = 3).

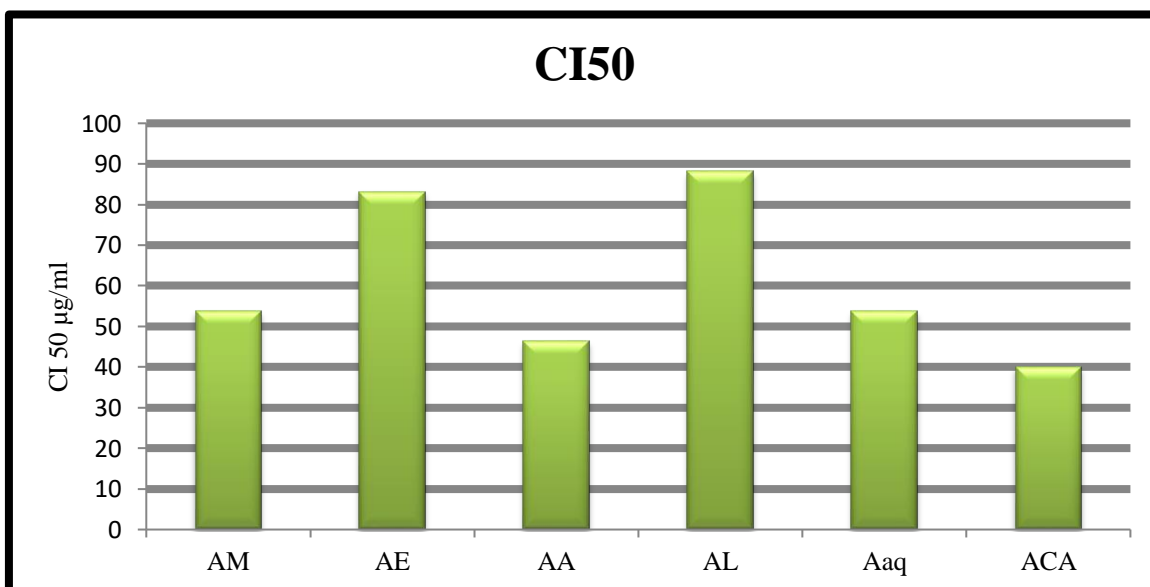


Figure V.52 : Valeurs des CI50 de l'inhibition de l'enzyme α - glucosidase par les extraits et fractions d'*A. halimus* en comparaison avec l'acarbose . ACA : acarbose, AM: extrait méthanolique, AA : extrait aqueux, AE : extrait acétate d'éthyle, AL : extrait flavonoïdes et Aaq : fraction aqueuse. Valeurs exprimées en moyenne \pm ESM (n = 3).

Nous avons utilisé l'acarbose comme un contrôle positif (CI50 = 40.03±0.67 µg/ml) afin d'évaluer la capacité inhibitrice des fractions et extraits de nos plantes :*E. alata* et *A.halimus* pour l'enzyme α -glucosidase.

Nous avons remarqué que les extraits aqueux d'*E. alata* et *A. halimus* (CI50 = 44,37 ± 0.47 µg/ml, CI50 = 46.15 ± 1.39 µg/ml respectivement) et fractions aqueuse (CI50 = 48.93 ± 1.26 µg/ml, CI50 = 58.25 ± 0.89 µg/ml) ont enregistré les meilleurs résultats d'inhibition enzymatique α -glucosidase. Mais moins que celle du standard antidiabétique (CI50 = 40.03 ± 0.67 µg/ml).

L'ensemble des résultats obtenus ont montré que tous les extraits et fractions testées des deux plantes ont inhibé l'activité des deux enzymes : α -amylase et α -glucosidase avec des valeurs CI50 variables. Cependant, nous avons constaté que l'activité inhibitrice des échantillons a été plus importante pour l' α - amylase.

Dans une étude sur les plantes utilisées dans la thérapie du diabète sucré, Said et al. (2008) ont cités *A.halimus*.

Mule et Naikwade, (2019), ont motionné *A.halimus* comme un remède populaire pour le traitement du diabète sucré. Dans cette étude, le potentiel antidiabétique a été évalué chez des rats diabétiques induits par la streptozotocine. Le résultat a suggéré la réduction significative de la glycémie dans le sang.

Des recherches antérieures ont prouvé l'efficacité d'*A. halimus* à réguler la glycémie. Il a été démontré que l'extrait eau/éthanol de *Juglans regia*, *Olea europaea* (feuilles), *Urtica dioica* (parties aériennes) et *A.halimus* (feuilles) provoque une diminution de l'absorption du glucose dans l'intestin du rat et une baisse substantielle de la glycémie chez les rats qui ont le diabète type 2 induits par la streptozotocine. Chez 16 volontaires humains atteints de diabète type 2, des taux de glucose cliniquement acceptables ont été atteints dans les 2 à 3 semaines suivant le traitement. Au cours de la première semaine, le mélange végétal a considérablement réduit le taux de glucose de 290 à 210 mg/dl. (Bashar Saad et al .,2022)

Dans l'autre côté, Mufti et al. (2022) ont étudié la capacité inhibitrice d'un extrait des fruits d'*E. alata* par rapport à l' α -glucosidase et à l' α -amylase. Ils ont trouvé que Les taux de piégeage des enzymes par cet extrait ont augmenté avec la concentration de 0,2 à 1 mg/mL et que L'inhibition de l' α -glucosidase et de l' α -amylase a atteint des valeurs maximales de 65,14 % et 59 % à 1 mg/ml avec une activité antidiabétique comparable à celle du contrôle positif (acarbose).

Ben lamine et al. (2019) ont rapporté que le décocté d'*éphédra* a montré une importante activité inhibitrice contre l' α -glucosidase et l' α -amylase par rapport au contrôle acarbose (CI50 =1,60 et 3,88 mg/ml, respectivement), tandis que son effet sur l' α -amylase était modéré. Ces résultats ont démontré les activités inhibitrices spécifiques de l'extrait d'*éphédra* pour l' α -glucosidase plus que pour l' α -amylase, contrairement à nos résultats où on a trouvé une activité α -amylase plus que l'activité α -glucosidase.

Une recherche faite par Jaradat et al. (2021) sur l'activité inhibitrice de l' α -amylase des fractions de l'extrait de fruits d'*E. alata* comparée au contrôle positif acarbose a montré que La fraction de méthanol était l'inhibiteur le plus puissant de l' α -amylase, avec une IC50 de $9,43 \pm 0,6 \mu\text{g/ml}$, comparé à $28,84 \pm 1,22 \mu\text{g/ml}$ pour l'acarbose, le composé de référence, et la fraction aqueuse a une activité similaire avec une IC50 de $16,37 \pm 0,58 \mu\text{g/ml}$. En revanche, les autres fractions ont des activités plus faibles contre cette enzyme ce qui est en accord avec nos résultats.

Pour l' α -glucosidase, La fraction méthanol a exercé la plus grande action inhibitrice sur l' α -glucosidase avec une CI50 de $46,16 \pm 0,63 \mu\text{g/ml}$, comparée à celle de l'acarbose, le contrôle de référence, à $37,15 \pm 0,33 \mu\text{g/ml}$. Ces résultats concordent avec nos résultats où nous avons trouvé CI50 de $49,92 \pm 0,49 \mu\text{g/ml}$ pour l'extrait méthanolique comparée à celle de l'acarbose CI50 de $40,03 \pm 0,67 \mu\text{g/ml}$

Les résultats obtenus dans cette recherche, fournissent des preuves supplémentaires qui vont dans le sens d'études précédentes selon lesquelles les polyphénols naturels peuvent inhiber l'activité des enzymes hydrolysant les glucides comme l' α -amylase et l' α -glucosidase (Tundis et al., 2010).

De nombreuses études ont rapporté que l'inhibition de l' α -amylase et de l' α -glucosidase semblait être une cible thérapeutique importante pour réguler l'hyperglycémie et le diabète sucré (Sarikurkcu et al., 2020). En effet, l'inhibition de ces enzymes réduit le niveau intestinal de glucose (Marmouzi et al. 2015).

Les propriétés antihyperglycémiques d'*E.alata* peuvent être liées à leur contenu en métabolites comme cela a été précédemment rapporté pour d'autres espèces (Tlili et Sarikurkcu, 2020 ; Tlili et al., 2019). Rjeibi et al. (2020) ont rapporté que la capacité d'inhibition est le résultat d'une réaction entre les groupes hydroxyles des composés bioactifs des extraits et les résidus d'acides aminés des enzymes α -amylase et α -glucosidase, entraînant une réduction de leur activité.

Conclusion générale

Conclusion

La découverte de ressources naturelles du règne végétal reste capitale pour la mise au point de nouveaux remèdes thérapeutiques. Le recours aux plantes médicinales s'avère être un choix pertinent face aux risques de contamination précis ou à la nécessité de réduire ou remplacer les conservateurs chimiques ou synthétiques. Aussi, leur utilisation à très faibles doses est envisageable, en raison de leur grande efficacité.

A travers cette recherche, nous apportons notre contribution à la valorisation *in vitro* des activités biologiques des extraits et fractions d'*E.alata* et *A. halimus*, des plantes largement utilisées en thérapie traditionnelle.

Les résultats de l'enquête sur les deux plantes fournissent suffisamment de preuves que les plantes médicinales jouent toujours un rôle important dans le système de soins de santé de la population de Béchar. Au cours de cette enquête, il a été observé que les personnes interrogées utilisent *E.alata* et *A. halimus* pour traiter de nombreuses maladies.

L'analyse phytochimique a montré que les extraits des deux plantes contiennent un mélange de substances phytochimiques comme les flavonoïdes, les alcaloïdes, saponines et tannins. D'autre part, l'extrait aqueux d'*E. alata* a un effet antibactérien prometteur sur différents types de bactéries (bactéries gram positives et gram négatives) ainsi qu'un effet antifongique. Tandis que, les extraits et fractions *A. halimus* ont un pouvoir antimicrobien modéré. Le pouvoir antioxydant réducteur de l'ion ferrique (FRAP) et les tests 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ont indiqué que les extraits des deux plantes ont une puissante activité antioxydante. De plus, ils ont présenté des activités inhibitrices puissantes sur l' α -amylase et l' α -glucosidase.

Les deux espèces *E.alata* et *A. halimus* sont riches en métabolites secondaires, une exploitation de leurs propriétés antioxydante, antidiabétique et antimicrobienne implique une recherche plus poussée de leurs principes actifs.

Un travail complémentaire s'impose en vue

- 1) d'identifier les différentes molécules en particulier les composés phénoliques présents dans les extraits et les purifier en utilisant diverses techniques chromatographiques notamment la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et des méthodes spectrales pour l'élucidation structurale.

- 2) Evaluer et tester les différentes molécules isolées in vivo sur différents modèles biologique en vue de les utiliser à des fins thérapeutiques.
- 3) Connaître les mécanismes d'action exacte.
- 4) Rechercher des effets toxiques aigue et chronique des extraits par des tests de toxicité.
- 5) Tester d'autres activités qui pourraient être présentes dans ces plantes.

Références bibliographiques

A

Abd El-Rahman H.H., Mohamed M.I., Gehad A.E.A., Awadallah I.M. (2006). Ameliorating the Anti-nutritional factors effect in *Atriplex halimus* on sheep and goats by ensiling or polyethylene glycol supplementation. *Int. J. Agr Biol*, 8 (6): 766–769

Abdel Rahman S.M., Abd-Ellatif S.A., Deraz S.F., Khalil A.A. (2011). Antibacterial activity of some wild medicinal plants collected from western Mediterranean coast, Egypt: Natural alternatives for infectious disease treatment. *African Journal of Biotechnology*, 10, 10733-10743

Adjanohoun E et Aké-Assi L. (1979). Contribution au recensement des plantes médicinales de Côte d'Ivoire. Centre national de la floristique, 32p.

Adiko N.M., Okpekon A.T., Bony F.N., Koffi K.K.V., Kablan B.J., Assi Y.J., Ake-Assi L., Champy P. (2013). Criblage phytochimique de plantes utilisées en ophtalmologie traditionnelle, répertoriées sur les marchés d'Abidjan. *J. sci. pharm. biol*, 14, 10-21.

Aharonso Z., Shani J., Sulman F.G. (1969). Hypoglycaemic effect of the salt bush (*Atriplex halimus*) - a feeding source of the sand rat (*Psammomysobesus*), *Diabetologia* 5: 379-383.

Ahmed M.F., Kazim S.M., Ghori S.S et al. (2010). Antidiabetic activity of *Vinca rosea* extracts in alloxan-induced diabetic rats. *Int Endocrinol*, 2010:841090.

Akin M., Aktumsek A. (2009). Antibacterial activity and composition of the essential oils of *EuCalyptus Camaldulensis* Dehn. And *Myrtus communis* L. growing in Northern Cyprus. *African Journal of Biotechnology*, 9, 53-535

Al-douri N.A. (2000). A survey of medicinal plants and their traditional uses. *Pharm Biol*, 38:74–79.

Al-Qarawi A.A., Abdallah E.F., Abeer H. (2011). *Ephedra alata* as biologically based strategy inhibit aflatoxigenic seed borne mold. *African Journal of Microbiology Research*, 16(5):2297-2303.

Al-Snafi AE. (2017). A review on *Dodonaea viscosa*: a potential medicinal plant. *IOSR J. Pharm.* 7(2):10–21.

Alves, R. et al. (2013). Antifungal Constituents from the Roots of *Piper dilatatum* Rich. *Journal of Chemistry*, 2013 :2090-9063.

Amarowicz R. and Troszyńska A. (2004). Antioxidant and antiradical activity of extracts of phenolic compounds from red bean. *Czech J. Food Sci.* 22, 206– 208.

Andersen O.M., Markham K.R. (2006). *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications.* CRC Press, 2021 :7.

Antolovich M., Prenzier P., Patsalides E., McDonald S. and Robards K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127, 183-198.

Arnous A., Makris DP. Kefalas P. (2001). Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 5736-5742.

Aruoma O. (2003). Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mut Res* 523-524: 9-20.

Avato P., Bucci R., Tava A., Vitali C., Rosato A., Bialy Z., et al. (2006). Antimicrobial activity of saponins from *Medicago* sp.: structure-activity relationship. *Phytother. Res.* 20 : 454–457.

B

Bagheri-Gavkosh S., Bigdeli M., Shams-Ghahfarokhi M., et al. (2009).Inhibitory effects of *Ephedra major* Host on *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. *Mycopathologia*, 168(5): 249-255.

Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008).Biological effects of essential oils—A review. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446–475.

Balouiri M., Sadiki M., Ibnsouda SK.(2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal*, 6(2):71-79.

Bashar S., Abdalsalam K., Sameena Z.H.(2022).Anti-Diabetes Middle Eastern Medicinal Plants and Their Action Mechanisms.Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2022: 2276094.

Belouad A.(2001). Plants medicinales d'Algérie.Office des publications universitaires Alger. pp. 284.

Bendahou M, Muselli A., Grignon-Dubois M., Benyoucef M., Desjobert M.J. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. Essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chemistry* 106, 132–139.

Benhammou N., Atik Bekkara F., Coustard J.M. (2009). Antioxidant activity of methanolic and water extracts from *Marrubium deserti* de Noë and *Thymelaea microphylla* from Algerian Sahara. *Advance in Food Science*, 31 (4): 194-201.

Benkhnigui O., Zidane L., Fadli M., Elyacoubi H., Rochdi A., Douira A. (2011).Étude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Mechraâ Bel Ksiri (Région du Gharb du Maroc). *Acta Bot. Barc*, 53: 191-216.

Biyiti L ., Meko'o D., Tamzc V., Amvam Zollo P. (2004). Recherche de l'activité antibactérienne de quatre plantes médicinales camerounaises. *Pharm. Med. Trad. Afr.*, 13: 11- 20.

Boozer C.N., Nasser J.A., Heymsfield S.B., Wang V., Solomon J.L. (2001). An herbal supplement containing Ma Huang-Guarana for weight loss: a randomized, double-blind trial, *International Journal of Obesity & Related Metabolic Disorders*, 25:316-324.

Bougandoura N., Bendimerad N. (2012). Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briq. Nature et Technology, 9 : 14.

Boumerfeg S., Baghiani A., Messaoudi D., Khennouf S., Arrar L. (2009). Antioxidant properties and xanthine oxidase inhibitory effect of *Tamus communis* L. root extracts. Phytotherapy Research, 23: 283-288.

Bruneton J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes médicinales – Techniques et documentations, 3ème Edition, Lavoisier.

Bruno D., Agnès M. (2015). Traité de neurologie : démences. Doin, France.

Burt S.A. (2004a). Essential oils: their antibacterial properties and pontiel applications in foods. International Journal of Food Microbiolog, 94 (3), 22-25.

Burt S.A. (2004b). Des huiles essentielles, leurs propriétés antibactériennes et applications dans les aliments-Un examen. International Journal of Food Microbiolog, 94, 223-253.

Busatta C., Vidal R.S., Popiolski A.S., Mossi A.J., Dariva C., Rodrigues M.R.A., Corazza F.C., Corazza M.I., Oliveira J.V., Cansian R.I. (2008). Application of *Origanum majorana* L.essential oil as an antimicrobial agent in sausage. Food Microbiol, 25: 207-211.

Bussmann R.W., Sharon D., Diaz D., Barocio Y. (2008). Peruvian plants canchalagua (*Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze), hercampuri (*Gentianella alborosea* (Gilg.) Fabris), and corpus way (*Gentianella bicolor* (Wedd.) J. Pringle) prove to be effective in the treatment of acné. Arnaldoa, 15(1):149-152.

Bylka W., Stobiecki M., Frahski R. (2001). Sulphated flavonoid glycosides from leaves of *Atriplex hortensis*. Acta Physiol. Plant, 23 (3): 285-290.

Bylka W. (2004). A new acylated flavonol diglycoside from *Atriplex littoralis*. Acta. Physiol Plant, 26(4): 393-398.

C

Calop J., Limat S., Frnandez C. (2008). Pharmacie clinique et thérapeutique. 3ème Ed. Masson. Elsevier Masson.

Carolina H.P., Johan L.F., Vuyisile S. (2011). Antifungal free fatty acids: A Review. Science against microbial pathogens, 61-73.

Caveney S. D. A., Charlet H., Freitag M., Maier-Stolte et al. (2001). New observations on the secondary chemistry of world Ephedra (Ephedraceae). American journal of botany, 88(7), 1199-1208.

Cavin. (1999). Invistigationphytochimique de trois plantes Indonisiennes aux propriétés antioxydante et antiradicalaire : *Tinospora crispa* (Ménispermacées), *Merremia emarginata* (Convolvulacées) et *Oropea enneandra* (Annonacées). Thèse de Doctorat. Univercité de Lausanne.Suisse.

Celiktas O., Hames Kocabas E., Bedir E., Vardar Sukan F., Ozek T., Baser K. H .C (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. Food Chemistry, 100: 553–559.

Chebouat E., Gherraf N., Dadamoussa B., Allaoui M., Chirite A., Zellagui A.(2016). Chemical composition of the dichloromethane extract of *Ephedra alata* leaves and flowers. Der Pharmacialetter, 8 (6):10-13.

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*. derPharmacialettre, 6 : 27-30.

Cheyrier V. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. The American journal of clinical nutrition, 81: 223-229.

Chevallier A. (1996). The Encyclopedia of Medicinal Plants. London: Dorling Kindersley.

Chung K. T., Wong T. Y., Wei C. I., Huang Y. W., Lin Y. (1998). Tannins and human health: a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 38(6), 421-464.

Cimanga K., Kambu K., Tona L., Apers S., De Bruyne,T., Hermans N., Totte J., Pieters L., Vlietinck AJ. (2002). Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. J Ethnopharmacol, 79(2):213-20.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. (2006). Methods for dilution antimicrobial susceptibility testing for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA; 26 (2).

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. (2010).Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria, Approved Guideline, 2nd. ed., CLSI document M45-A2., 950 west Valley Roadn Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA.

Conrad G et Roche M.A. (1965). Etude stratigraphique et hydrogéologique de l'extrémité méridionale de la Hamada du Guir. Bull. Soc.géol. Fr., 7e série. 695-712.

Cosio S., Buratti S., Manninon S., Benedetti S. (2006). Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extracts from the Labiatae family. Food chemistry, 97 (4): 725-731.

Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R., Wyllie S.G. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). Journal of Applied Microbiology, 88: 170–175.

Craft D. B., Kerrihard L. A., Amarowicz R., Pegg B. R. (2012). Phenolbased antioxidants and the in vitro methods used for their assessment. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 11(2): 148-173.

Cristani M., D'arrigo M., Mandalari G., Castelli F., Sarpietro M.G., Micieli D. (2007). Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with modal membranes:

Implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 6300-6308.

Croteau R., Kutchan T.M., Lewis N.G. (2000). Natural products (secondary metabolites). *Biochem. Mol. Biol. Plants*, 24:1250–1319.

D

De Carvalho Nestor E.N., de Carvalho A.S., Ferreira L.M.(2003). Experimental model of induction of diabetes mellitus in rats. *Experimental Models. Acta Cir. Bras*, 6: 4-7.

De Fronzo R.A. (1999). Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med*, 131: 281–303.

De Pooter H.L. et Schamp N. (1986). Comparaison of the volatils composition of some *Calamintha satureja* species. In: *Progress in essential oil research*. Ed. E-J. Brunk, Walter De Gruyter, Berlin.

Dehimat A., Azizi I., Brragon-Montero V., Khettal B. (2021). In vitro antioxidant and inhibitory potential of leaf extracts of *Varthemia sericea* against key enzymes linked to type 2 diabetes. *Jordan Journal of Biological Sciences (JJBS)*, 14.2021.

Delattre C., Bernard D., Mehul B., Thomas-Collignon A., Donovan M. (2005). Identification and characterization of a novel retroviral-like aspartic protease specifically expressed in human epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*, 125: 278-287.

Derwich E., Benziane Z., Boukir A. (2010). Chemical Composition of Leaf Essential Oil of *Juniperus phoenicea* and Evaluation of Its Antibacterial Activity (Morocco). *Int. J. Agric. Biol*, 12 (2), 199-204.

Drissa D., Rokia S., Hamsétou Y., Aminata T., Kassoum C., Ababacar M. (2004). Étude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam. (Rhamnaceae), utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. *C. R. Chimie*, 7: 1073-80.

E

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

El-Seoud K A.A., El-Aasr M., Kabbash A. (2016). Antimicrobial and immunodulatory activities of flavonol glycosides isolated from *Atriplex halimus* L. *Herb. J Pharm Sci Res*, 8, 1159-1168.

Emam S.S., (2011). Bioactive constituents of *Atriplex halimus* plant, *Journal of Natural Products*, 4:25-41.

F

Farnsworth N.F. (1966). Biological and phytochemical screening of plants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55: 225–276.

Fasseas M.K., Mountzouris K.C, Tarantilis P.A., Polissiou M., Zervas G.(2007). Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. *Food Chemistry*, 106:1188-1194.

Feknous S., Saidi F., said M. (2014). Extraction, caractérisation et identification de quelques métabolites secondaires actifs de la mélisse (*Melissa officinalis* L.) Nature & Technology, 11:7-13.

Fengfeng W., Yamei J., Xueming X. (2017). Electrofluidic pretreatment for enhancing essential oil extraction from citrus fruit peel waste. J. Clean. Prod, 159, 85–94.

FID (Fédération Internationale du Diabète). (2017). IDF Diabetes Atlas, 8th ed. Brussels, Belgium.

Frenclat A., Le Houérou N.H. (1971). Les Atriplex en Tunisie et en Afrique du Nord. Doc. Tech. N° 7, FAO, Rome.

Friedman M., Henika P. R., Mandrell R. E. (2002). Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. J Food Prot, 65, 1545–1560.

Frutos P., Hervás G., Giráldez G.F., Mantecón A.R. (2004). Tannins and ruminant nutrition. Spanish Journal of Agricultural Research, 2 (2): 191-202.

G

Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.B., Taghizadeh M., Astaneh S.A. and Rasooli I., 2007. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. Food Chem., 102: pp.898-904.

Ganem S., El-Magly U.(2008). Antimicrobial activity and tentative identification of active compounds from the medicinal *Ephedra alata* male plant. ITU Med SC.3 (1), 7-15.

Ghourri M, Zidane L ., Douira A. (2013). Catalogue des plantes médicinales utilisées dans le traitement de la lithiase rénale dans la province de Tan-Tan (Maroc saharien). Int. J. Biol. Chem. Sci. 7(4): 1688-1700.

Giamperi L., Fraternali D., Ricci D. (2002). The In vitro Action of Essential oils on Different Organisms .J.Essent.OilRes., Vol.14, pp:312-318. ,

Gillies C. L., Abrams K. R., Lambert P. C., Cooper N. J., Sutton A. J., Hsu R. T., Khunti K. (2007). Pharmacological and lifestyle interventions to prevent or delay type 2 diabetes in people with impaired glucose tolerance: systematic review and meta-analysis. British Medical Journal, 334 299 302.

Gobert M., Rémond D., Loonis M., Buffière C., Santé-Lhoutellier V., Dufour C. (2014). Fruits, vegetables and their polyphenols protect dietary lipids from oxidation during gastric digestion. Food ET Function, 5: 2166-2174.

Groppa M.D., Benavides M.P. (2008). Polyamines and abiotic stress: Recent advances. Amino Acids, 34:35–45.

Guettoche S. (2021). Etude phytochimique d'*Atriplex halimus* et la détermination de son activité biologique (Région Ouargla Algérie). Doctorat en sciences. Université Kasdi Merbah Ouargla.

Guérin-Faublée V., Carret G. (1999).L'antibiogramme: principes, méthodologie, intérêt et limites. Journées nationales GTV-INRA, 5-12.

Guignard J.L., Dupont F. (2004). Botanique : systématique moléculaire, 13^{ème} 2dition. Masson Editeur.

Gulluce M., Sahin F., Sokmen M., Ozer H., Daferera D., Sokmen A., Polissiou M., Adiguzel A. et Ozkan H. (2007).Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. longifolia. Food Chemistry, 103: 1449– 1456.

H

HADJADJ K., Belkacem B., GUERINE L. (2020). Importance thérapeutique de la plante *Ephedra alata* subsp. *alenda* dans la médecine traditionnelle pour la population de la région de Guettara (Djelfa, Algérie). Lejeunia, Revue de Botanique. 201 : 0457-4184.

Hajjaj G.(2017). Screening phytochimiques, étude toxicologique et valorisation pharmacologique de *Matricaria Chamomilla* L. et de *L'ormenis Mixta* L. (Asteraceae). Thèse de Doctorat.

Hancock RE., Nijnik A., Philpott DJ. (2012). Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. *Nature Reviews Microbiology*, 10:243–254

Hammoudi R.(2015).Activités biologiques de quelques métabolites secondaires extraits de quelques plantes médicinales du Sahara méridional Algérien. Thèse de doctorat. Sciences biologiques. Université Kasdi Merbah-Ouargla. 147 p.

Havsteen B.H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Therapeut*, 96, 67– 202.

Heatley N.G. (1944). *Biochem.J.*,38,61.

Heinrich M, Kufer J, Leonti M, Pardo-de-Santayana M. (2006). Ethnobotany and ethnopharmacology—Interdisciplinary links with the historical sciences. *J Ethnopharmacol.* 107(2):157–60.

Hertog M.G., Feskens E.J., Hollman P.C. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, 342: 1007-11.

Hibar K., Mejda K., Haifa M., Mohamed. (2006). Effet inhibiteur *in vitro* et *in vivo* du *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporum* f. Sp. *radicis-lycopersici*, *Biotech. Agro. Soc. Environ*, 9 (3):163 – 171.

Hsieh R.J. et Kinsella J.E. (1989).Lipoxygenase Generation of specific volatile flavor carbonyl compounds in fish tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 279-286.

Hyuga S., Hyuga M., Oshima N., Maruyama T., Kamakura H., Yamashita T., Yoshimura M., Amakura Y., Hakamatsuka T., Odaguchi H. (2016).Ephedrine alkaloids-free *Ephedra* Herb extract: a safer alternative to *ephedra* with comparable analgesic, anticancer, and anti-influenza activities. *J. Nat. Med*, 70, 571-583.

I

Ibragic Set Sofic E. (2015). Chemical Composition of Various *Ephedra* Species. Bosnian Journal of Basic Medical Sciences, 15 (3):21-27.

IFRA analytical working, IFRA analytical. (2019). Determination of peroxide value, the international fragrance, September 10th 2019.

Iserin, P. (2001). Larousse Encyclopédie des plantes médicinales. Ed Larousse, pp10, 335.

J

Jaradat N., Dacca H., Hawash M., Abualhasan M.(2021). *Ephedra alata* fruit extracts: phytochemical screening, anti-proliferative activity and inhibition of DPPH, α -amylase, α -glucosidase, and lipase enzymes. BMC Chemistry, 15:41.

Jerbi A., Zehri S., Abdnnabi R., Gharsallah N., Kammoun M. (2016). Essential oil composition, free-radical-scavenging and antibacterial effect from stems of *Ephedra alata* in Tunisia. J. Essential Oil Bearing Plants, 19. 1503-1509.

Jimenez-Arellanes A., Meckes M., Ramirez R., Torres J., Luna-Herrera J., (2003). Activity against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican plants used to treat respiratory diseases. Phytotherapy Research, 17: 903-908.

Jiménez-Esquilín A.E., Roane T.M. (2005). Antifungal activities of actinomycete strains associated with high-altitude Sagebrush Rhizosphere. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 32:378–381.

Jinbing Liu. , Fengyan Wu., Lingjuan Chen , Liangzhong Zhao ., Zibing Zhao ., Min Wang ., Sulan Lei . (2012). Biological evaluation of coumarin derivatives as mushroom tyrosinase inhibitors; Food Chemistry;; 135; 2872–2878.

Juhas S., Bukovska A., Cikos S. (2009). Anti-inflammatory effects of *Rosmarinus officinalis* essential oil in Mice. Acta. Vet, 78: 121–127.

Juven B.J., Kanner J., Schved F., Weisslowicz H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. Journal of Applied Bacteriology, 76, 626 – 631.

K

Kalemba D., Kunicka A.(2003). Antimicrobial and antifungal properties of essential oils. Curr Med Chem, 10:813–829.

Kaloustian J., Chevalier J., Mikail C., Martino M., Abou L., Vergnes M.F. (2008). Étude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne. J Phytothér, 6:160-164.

Kasabri V., Afifi F.U., Hamdan I.(2011). Evaluation of the acute antihyperglycemic effects of four selected indigenous plants from Jordan used in traditional medicine. Pharm. Biol, 49, 687–695.

- Kessal A., Bouafia O. (2003).** Phytoscreening and antibacterial of the plants *Ephedra alata*, *Launaearesidifolia* and *Oudneya africana*. Diplôme d'ingénieur d'Etat. Université Kasdi Merbah-Ouargla. Mem. 66.
- Kessler R.C., Barker P.R., Colpe L.J., Epstein J.F., Gfroerer J.C., Hiripi E., Howes M.J., Zaslavsky A.M. (2003).** Screening for serious mental illness in the general population. *Archives of General Psychiatry*, 60:184–189.
- Kim Y.J., Lin N.C., Martin G.B. (2002).** Two distinct *Pseudomonas* effector proteins interact with the Pto kinase and activate plant immunity. *Cell*, 109, 589–598.
- Kirbag S., Zengin F., Kursat M. (2009).** Antimicrobial Activities of Extracts of some Plants. *Pakistan Journal of Botany*, 41(4): 2067-2070.
- Knekt P., Jarvinen R., Seppanen R., Heliovaara M., Teppo L., Pukkala E., Aromaa A. (1997).** Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am J Epidemiol*, 146:223–230.
- Koehlin-Ramonatxo C. (2006).** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20(4), 165-177.
- Konkon N.G., Simaga D. Adjoungova A.L. (2006).** Etude Phytochimique de *Mitragyna inermis* (Willd.) O. Ktze (Rubiaceae), plante à feuille antidiabétique. *Pharm. Méd. Trad. Afr*, 14, 73-80.
- Kra DK., Doumbia M., Klimaszewski J., Dagnogo M., Daouda A. (2009).** Soil/litter beetle abundance and diversity along a land use gradient in tropical Africa (Oumé, Ivory Coast). *Sciences et Nature*, (6) 2: 139-147.
- Kostova I (2005),** Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 5(1): 29-46.
- Kumara M., Agarwala R., Deyb K., Raib V., Johnsonc B. (2009).** Antimicrobial Activity of Aqueous Extract of *Terminalia chebula* Retz. On Gram positive and Gram negative Microorganisms. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 1 (1): 56-60.
- L**
- Lahsissene H.(2009).** Catalogue des plantes médicinales utilisées. *Lejeunia revue botanique* (186), 0457-4184.
- Lambert R. J. W., Skandamis P. N., Coote P. J., Nychas G. J. E. (2001).** A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol*, 91, 453–462.
- Lamine J.B., Boujbiha M.A., Dahane S., Cherifa A.B., Khlifi A., Chahdoura H., Yakoubi M.T., Ferchichi S., El Ayebe N., Achour L. (2019).** α -amylase and α -glucosidase inhibitor effects and pancreatic response to diabetes mellitus on wistar rats of *ephedra alata* areal part decoction with immunohistochemical analyses. *Environmental Science and Pollution Research*, 26: 9739-9754.
- Le Houérou H.N. (1992).** The role of saltbushes (*Atriplex* spp.) in arid land rehabilitation in the Mediterranean Basin: a review. *Agroforestry systems*, 18 (2) : 107-148

Lebovitz H.E. (1997). Alpha-glucosidase inhibitors. *Endocrinol. Metab Clin N Am*, 26: 539–551.

Lee K. W., Kim Y. J., Lee H. J., Lee C Y. (2003). Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. *J. Agric. Food Chem*, 51:7292-7295.

Lefsih K., Ronacles P., Yanguela J., Djenane D. (2010). Biological effects of Algerian essential oils and their application in liquid eggs. New challenges in foos preservation. Processing-Safety-Sustannibility, 11-1 Nov. Budapest-Hongrie.

Lenzen S. (2008). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51, 216–226.

Lu F., Foo L Y. (1995). Toxicological aspects of food antioxidants. In. Madhavi DL., Deshpande SS., Salunkhe DK (eds)., *Food antioxidants*. New York: Marcel Dekker, p.73-146

Lunn J, Theobald H (2006). The health effects of dietary unsaturated fatty acids. *Journal of Nutrition Bulletin* 31 :178-224.

M

Macheix J J., Fleuriet A. et Jay–Allemand C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes.

Mahdi S. (2021). Etude phytochimique et évaluation des activités hémolytique, antioxydante et antidiabétique des extraits et fractions enrichies en polyphénols de *Salvia officinalis* L. Thèse de Doctorat. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen.

Majhenic, L., kerges M.S., Knez Z.; 2007. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry*, 104, 1258–1268.

Makhloufi A. (2012). Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de bechar (*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru. Thèse de doctorat. Université Aboubaker Belkaid.

Mandal S., Yadan S., Yadav S.(2009). Anti-oxidants: a review. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 1: 102-204.

fJ.T.J., Guido R.M.M., Hans-Peter V., Aalt B. (2004). Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay, *Food and Chemical Toxicology*, 42:45-49.

Markham K.R. (1982). Techniques of flavonoid identification. Academic press, London, Chap. 1 and 2: 1-113.

Marmouzi I., El Madani N., Charrouf Z., Cherrah Y., Faouzi M.E.A. (2015). Proximate analysis, fatty acids and mineral composition of processed Moroccan *Chenopodium quinoa Willd.* and antioxidant properties according to the polarity. *Phytothérapie*, 13 (2) ,110-117.

Mehdioui R., Khaoudji A. (2007). Etude ethnobotanique auprès de la population riveraine de la forêt d'Amsittène : cas de la Commune d'Imi n'Tlit (Province d'Essaouira) ", Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat, section Sciences de la Vie, n°29,11-20.

Merzougui T., Kabour A., Bouanani A., Mekkaoui A., chebbah L.(2008). Un modèle de gestion intégrée des ressources en eau dans une zone hyperaride : Cas de l'oasis de Béni Abbès (Vallée de la Saoura, sud-ouest algérien). 13e Congrès Mondial de l'Eau, 1-4 septembre, Montpellier, France 1-12.

Mierlici I. D., Ghioghita, G., Capraru, G. (2009). Some cytogenetic effects induced in barley by the treatments with hydroalcoholic rosemary extract, Analele Științifice Ale Universității Alexandru Ioan Cuza din Iași, Secțiunea II A: Genetica și Biologie Moleculară, 10, 57-61.

Milardovic S., Ivekovic D., Grabaric, B.S. (2006). A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. Bioelectrochemistry, 68: 175-180.

Moreira M. R., Ponce A. G., Del Valle C. E., Roura S. I. (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. LWT, 38: 565-570

Mufti A, Tir Meriam, Zarei A, Contreras M, Gomez-Cruz I, Feriani A, Ghazouani L, Saadaoui E, Allagui M, Harrath A.H, Ramazani A., and Tlili N . (2022). Phytochemical Profiling of *Ephedra alata* subsp. *alata* Seeds by High-Performance Liquid Chromatography—Electrospray Ionization—Quadrupole-Time-of-Flight-Mass Spectrometry (HPLC-ESI-QTOF-MS), Molecular Docking, and Antioxidant, Anti-diabetic, and Acetylcholinesterase Inhibition. Natural product analysis, 55, 2022.

Muhizi T. (2008). Synthèse d'aminosucres conduisant à des biocides d'origine naturelle, Thèse de Doctorat, Université Bordeaux.

Mulas M.(2004). Potentialité d'utilisation stratégique des plantes des genres *Atriplex* et *Opuntia* dans la lutte contre la désertification. Short and Medium, Term Priority Environmental Action Programme (SMAP) Février 2004.

Mule V. S et Naikwade N. S. (2019). A review on promising anti-diabetic medicinal plants for treatment of diabetes mellitus. Int. Res. J. Pharm, 10 (3) 20 2230 – 8407.

N

Nawwar M M., Ishak M S., Michael H N., Buddrus J. (1984). Leaf flavonoids of *Zizyphus spina-christi*, Phytochemistry 23 (9) : 2110–2111.

N'Guessan K., Kadja B., Zirihi G., Traoré D., Aké-Assi L. (2009). Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Kroubo (Agboville, Côte-d'Ivoire). Sciences et Nature, 6(1).

Nedjmi B., Glit B. (2012). Les steppes algériennes : causes de déséquilibre . Algerian J. Arid Environ. 2, 50-61.

Nedjimi B. B., Guit M., Toumi., Beladel B., Akam A., Daoud Y. (2013). *Atriplex halimus* subsp. *schweinfurthii* (Chenopodiaceae) description et écologie utilisation comme fourrage et comme plante thérapeutique. *Fourrages*, 216: 333-338.

Nemlin, J., Brunel, J. E. (1995). Fascicule de Travaux Pratiques de Matière Médicale (3^e année). Université Nationale de Côte-d'Ivoire. Faculté de Pharmacie. Département de Pharmacognosie. Laboratoire de Phytologie, 47.

Nijveldt J., Van Nood E., Van Hoorn D., Boelens P., Van Norren K. et Van Leeuwen P. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American journal of clinical nutrition*, 74: 418-425.

Q

Omidbeygi M, Barzegar M, Hamidi Z, Naghdibadi H (2007) Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control*, 18: 1518–1523.

Ounaissia K., Bennadja S., Aliane A., Abdelghani D. (2020). Phytochemical screening and anti-bacterial activity of methanolic extracts of the aerial parts of *atriplex halimus* L., from biskra (algeria) *International Journal of Agricultural and Natural Sciences E*. 2651-3617 13(1): 26-33.

OussouKR., Yolou SF., Tue Bi B., Kanko C., Boti JB., Ahibo C., Casanova J. (2010). Etude Chimique Bio-Guidée de L'huile Essentielle de *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae). *European Journal of Scientific Research* 40(1), 50-59.

Oyaizu M.1986. Studies on products of browning reaction- Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307–315.

Ozenda P.(1991) Flore et végétation du Sahara. Centre National De La Recherche Scientifique, Paris (3^{ème} Ed.).

P

Papanastasis VP. (2000). Land degradation caused by overgrazing and wildfires and management strategies to prevent and mitigate their effects. In: Enne, G., Zanolla, Ch. and Peter, D., Eds., *Desertification in europe: mitigations strategies, land-use planning*, European Commission, EUR 19390, Luxembourg, 187-198

Pibiri M.(2006). Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorat, école polytechnique fédérale de lausanne.

Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M.(2001). Antioxidants in food, Practical applications. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK. 22-70.

Pyrzynska K., Biesaga M. (2009). Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *Trends in Analytical Chemistry*, 28(7).

R

Ragan M. A., Glombitza K. (1986). Phlorotannin: Brown algal polyphenols. *Progress in Physiological Research*, 4: 177-241.

Ranga R. A., Ravi S.V., Baskaran R. G. (2009). Identification of carotenoids from green alga *haematococcus pluvialis* by hplc and lc-ms (apci) and their antioxidant properties. *Journal of microbiology and biotechnology*, 19(11):1333-41.

Rhayour, K. (2002), Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. Thèse du Doctorat. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah –Fès.

Rhayour K. (2003). Mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and their phenolic major components in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Journal of essential oil research*, 15: 356-262.

Rjeibi I., Zaabi R., Jouida W.(2020). Characterization of polysaccharides extracted from pulps and seeds of *Crataegus azarolus* L. var. *aronia*: Preliminary structure, antioxidant, antibacterial, α -amylase, and acetylcholinesterase inhibition properties. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020:1–11.

Roberts M.F. (2013). Alkaloids: biochemistry, ecology, and medicinal applications. Springer Science et Business Media. New York, USA.

Roux D., Catier O.(2007). Botanique, pharmacognosie, phytothérapie. 3^{ème} édition, Wolters Kluwer.

Rustaiyan A., Javidnia K., Farjam M.H., Mohammadi M.K., Mohammadi N. (2011). Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of the methanolic extracts of *Ephedra laristanica*, *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 5713-5717.

S

Said O., Fulder S., Khalil K., Azaizeh H., Kassis E., Bashar Saad B. (2008). Maiting a physiological blood glucose level with Glucolevel, a combination of four anti-diabetes plants used in the traditional arabal medicine. *Evid Based Complement Alternat Med*, 5 (4) :421 – 428.

Sanchez-Moreno C., Larrauri Jose A., Saura-Calixto F. (1998). A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76 (2): 270-276.

Sarikurkcu C., Ozer M. S., Tlili N.(2020). Comparison of the Influence of the Solvent on the Extraction of the Bioactive Compounds from *Marrubium lutescens* Using Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry (LC-ESI-MS/MS). *Analytical Letters*, 53 (14):2222–34.

Sauvaire Y., Baissac Y., Leconte O., Petit P., Ribes G. (1996). Steroid saponins from fenugreek and some of their biological properties” in *Saponins used in food and agriculture*. *Advances in experimental medicine and biology*. Eds. G. R. Waller and K. Yamasaki (Boston, MA: Springer).

Schauenberg P., Paris F. (2006). Guides des plantes médicinales analyse, description et utilisation de 400 plantes. Edition delachaux et niestlé, Paris.

Shalabia S. E.(2011). Bioactive constituents of *Atriplex halimus* plant. *Journal of Natural Products*, 4: 25-41.

Shibano M., Kitagawa S., Nakamura S., Akazawa N., Kusano G. (1997). Studies on the constituents of *Broussonetia* species. II. Six new pyrrolidine alkaloids, broussonetine A, B, E, F and broussonetinine A and B, as inhibitors of glycosidases from *Broussonetia kazinoki* SIEB. *Chem Pharm Bull*, 45: 700–705.

Shukla Set Mehta A.(2015). Anticancer potential of medicinal plants and their phytochemicals: a review. *Brazilian Journal of Botany*,38:199–210.

Singh P., Kumar A., Dubey N.K., Gupta R. (2009). Essential oil of *Aegle marmelos* as a safe plantbased antimicrobial against postharvest microbial infestations and aflatoxin contamination of food commodities. *Journal of food science*, 74 (6): 302-307.

Sokmen A., M. Gulluce H.A., Akpulat D., Daferera B., Tepe M., Polissiou M., Sokmen., F. Sahin .(2004). The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Control*, 15, 627-634.

Soltan M.M., Zaki A., Kamal A. (2009). Antiviral screening of forty-two Egyptian medicinal plants.*Journal of ethnopharmacology*, 126(1), 102-7.

Soro S., Ouattara D., Guédé N.Z., Coffi K. (2010). Effet Inhibiteur in Vitro et in Vivo de l'extrait de Poudre et de l'huile Essentielle de *Xylopiia Aethiopica* (Dunal) A. Rich. (Annonaceae) sur *Fusarium oxysporum* f. sp *Radicis-lycopersici* (Forl), Champignon Parasite des Cultures de Tomate .*European Journal of Scientific Research*, 39(2) :279-288.

T

Tadhani M B., Patela V.H, Subhasha R. (2007). The essential balance: risks and benefits in food safety and quality. In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20 :323-329

Thalapaneni N., Chidambaram K., Ellappan T., Sabapathi M., Mandal S. (2008). Inhibition of carbohydrate digestive enzymes by *talinium portulacifolium* (forssk) leaf extracts. *J Compl Integr Med*, 11: 5.

Tili N., Kirkan B., Sarikurcu C. (2019).LC–ESI–MS/MS characterization, antioxidant power and inhibitory effects on α -amylase and tyrosinase of bioactive compounds from hulls of *Amygdalus communis*: The influence of the extracting solvents. *Ind. Crops Prod.*, 128, pp. 147-152

Tripathi V.N., Srivasta S. (2006). Extracytoplasmic storage as the nickel resistance mechanism in a natural isolate of *pseudomonas putida* S4. *Can.J. Microbiol*, 52,287-292.

Tumbas V T., Ćetkovic G S., Djilas S M., Canadanovic-Brunet J M., Vulic J J., Knez Z. (2010). Antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulata*) peel. *Biblid*. 40, 195-203.

Tundis R., Loizzo M., Menichini F. (2010). Natural products as α -amylase and α -glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update. *Mini Rev Med Chem*, 10(4):315–331.

U

Ultee A., Kets E. P. W., Smid J. (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol*,65: 4606–4610.

Ultee A., Smid E.J. (2001). Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *Int J Food Microbiol*, 64: 373–378.

Ultee A., Bennik M. H., Moezelaar R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol*,68: 1561–1568.

V

Valgas C, de Souza SM, Smânia EFA, Smânia A. (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Braz J Microbiol.* ; 38:369–380.

Valko M., Rhodes C. J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact* ,160 1–40.

Vanden Berghe D.A., Vlietinck A.J. (1991). Screening Methods for Antibacterial Agents from Higher Plants. In: Dey, P.M., Harborne, J.B. and Hostettman, K., Eds., *Methods in Plant Biochemistry, Assay for Bioactivity*, Vol. 6. Academic Press, London, 47-69.

Vangah-Manda M. O.(1986). Contribution à la connaissance des plantes médicinales utilisées par les ethnies Akans de la région littorale de la Côte-d'Ivoire. Thèse de Doctorat de 3ème Cycle, Université Nationale.

Vârban D.I., Duda M., Vârban R., Muntean S. (2009). Research Concerning the Organic Technology for *Satureja Hortensis* L. Culture. *Bulletin UASVM Agriculture*. 66 (2) 225- 229.

Vermerris W., Nicholson R. (2006). Isolation and identification of phenolic compounds. *Phenolic compound biochemistry*. Springer, 151–196.

Vierling E.(2008). Aliments et boissons filières et produits. 3ème édition Biosciences et techniques. Paris. 15-16.

Vivas N. (2002). Mise au point sur les tanins oenologiques et bases d'une nouvelle définition qualitative. *Bulletin de L'O.I.V.* P853-854.

Vladimir-Knežević S., Blažeković B., Štefan M. B., Babac M. (2012). Plant polyphenols as antioxidants influencing the human health. In V. Rao (Ed.), *Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health*. 155-180.

W

Wahid A., Ghazanfar A. (2006). Possible involvement of some secondary metabolites in salt tolerance of sugarcane. *J. Plant Physiol*, 163:723–730.

Walker D. J., Lutts S., Sanchez-Garcia M., Correal E. (2014). *Atriplex halimus* L.: its biology and uses. *J. Arid Environ.* 100: 111-121.

Wilkinson J.M. (2006). Methods for testing the antimicrobial activity of extracts. Chapitre VIII. Pp.157-165. In Ahmad I., Aqil F. et Owais M. Modern Phytomedicine: Turning Medicinal Plants into Drugs. Ed. WILEY-VCH Verlag GmbH et Co. KGaA, Weinheim, 405p.

Wink M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64:3–19.

Wink M., (2011). Annual plant reviews, biochemistry of plant secondary metabolism. Vol. 40.

Worthington C. C. (1988). Worthington enzyme manual: enzymes and related biochemicals. Worthington Biochemical Corporation.

Y

Yemoa A.L., Gbenou J.D., Johnson R.C., Djego J.G., Zinsou C., Moudachirou M., QuetinLeclercq J., Bigot A., Portael F. (2008). Identification et étude phytochimique des plantes utilisées dans le traitement traditionnel de l'ulcère de Buruli au Bénin. *Ethnopharmacologia*, 42: 48-55.

Yrjöen T. (2004). Extraction and Planar Chromatographic Separation Techniques in the Analysis of Natural Products. Faculty of Pharmacy of the University of Helsinki. Pp: 76.

Z

Zee-Cheng R.K. (1997). Anticancer research on Loranthaceae plants. *Drugs Future*, 22(5) : 515-530.

Zirihi GN.(1991). Contribution au recensement, à l'identification et à la connaissance de quelques espèces végétales utilisées dans la médecine traditionnelle et la pharmacopée chez les Bété du Département d'Issia, Côte d'Ivoire. Thèse de Doctorat, Université d'Abidjan.

Annexes

Annexe 1**Age**

A1 <20 A2 [20-40] A3]40-60] A4 >60

Sexe

Masculin Féminin

Situation familiale

Marié Célibataire

Origine de l'information

Achabe eux-mêmes Expérience des autres

Espèces	Maladie	Mode de Préparation	Partie utilisée	Dose utilisée
Alanda				
Gtaf				

Maladies : Appareil respiratoire (AR); Appareil digestif (AD); Appareil circulatoire (AC) ; Appareil génital (AG) ; Peau (P) ;Autres.

Mode de préparation : Infusion ; Décoction ; Poudre ; Fumigation ; Macération, Cataplasme.

Partie utilisée : Racine ; Tige ; Feuille ; Fleur ; Fruit ; autres.

Dose utilisée : Pincée ; Poignée ; Cuillerée ; Dose précise (Quantité en g / verre)

Annexe 2**Réactifs et réactions de caractérisation des tests phytochimiques**

- **Réactif de Wagner** : Dans 75 ml d'eau distillée dissoudre 2g d'iodure de potassium KI et 1.27 g d'iode I₂, le volume obtenu est ajusté à 100 ml avec l'eau distillée.
- **Réactif de Mayer** : Dissoudre 1.358 g de chlorure de mercure HgCl₂ dans 60 ml d'eau distillée puis 5g d'iodure de potassium KI dans 10 ml d'eau distillée. Mélanger les deux solutions et ajuster le volume total à 100 ml.
- **Alcool chlorhydrique** : Mélange à volumes égaux d'alcool à 95° et d'acide chlorhydrique concentré.

Liquueur de Fehling

- **Fehling A** : dissoudre 3.5 g de sulfate de cuivre pentahydraté CuSO₄.5H₂O dans 50 ml d'eau distillée.
- **Fehling B** : dissoudre 6.5 g d'ammoniaque NH₄OH, 17.3 g de tartrate de sodium et de potassium dans 35 ml d'eau distillé puis compléter le volume à 50 ml.

I. Extraction par l'eau

Dans un ballon, surmonté d'un réfrigèrent, On met 20 g de poudre de la plante dans un volume de 60 ml d'eau distillée; et on porte l'ensemble à reflux pendant 15 min. Après refroidissement, on filtre le mélange et le soumettre aux différents tests suivants.

a) Caractérisation d'amidon

On traite l'extrait aqueux la solution avec le réactif d'Amidon. L'apparition d'une coloration bleue-violacée indique la présence d'amidon.

b) Caractérisation des composés réducteurs

On traite 1 ml de la solution aqueuse avec 5 à 8 gouttes de liqueur de Fehling, après un chauffage, l'apparition d'un précipité rouge brique marque la présence des hydrates de carbones.

c) Caractérisation des saponosides

Dans une fiole jaugée à 250 ml, on met 2 g de poudre et 100 ml d'eau, on porte le mélange à ébullition modérée pendant une demi-heure. Après refroidissement, filtrer et ajuster le volume de filtrat à 100 ml d'eau. A partir de cette solution mère, préparer 10 tubes avec 1, 2,10 ml, le volume finale étant réajuster à 10 ml avec l'eau distillée .chacun des tubes est agité vigoureusement dans le sens de la longueur pendant 15

secondes. La formation d'une mousse persistante après 15 minutes confirme la présence des saponosides.

d) Caractérisation des tanins

À 1 ml de la solution testée, on ajout 1 ml d'eau distillée et on traite la solution avec 1 à 2 gouttes de solution de FeCl₃ (2%).Après quelque minutes l'apparition d'une coloration verte foncée indique la présence des tannins cathéchiquesou bleu-verte avec un précipité indique la présence des taninns galliques.

e) Caractérisation des alcaloïdes sels

On neutralise 15 ml d'extrait aqueux avec le NH₄OH (10%) jusqu'à pH=9, ensuite on extraire la solution avec 3x10 ml de chloroforme et on lave la solution chloroformique avec 3x2 ml d'HCl (10%) ;

Après, la solution aqueuse est traitée avec le réactif de Mayer et de Wagner, dont lequel : La formation d'un précipité jaune avec le réactif de Mayer ou la formation d'un précipité brun avec le réactif de Wagner indique la présence des alcaloïdes.

II. Extraction par l'éther diéthylique ou l'éther de pétrole

Dans un erlenon introduits 20 g de poudre de la plante 60 ml d'éther de pétrole. L'ensemble est homogénéiser par agitation manuelle pendant 30 min. après filtration du mélange, le filtrat obtenu est nommé filtrat éthéré 1. Le marc résiduel est extrait avec 60 ml d'éther de pétrole, après 30 min d'agitation, le mélange est filtré et conduit au filtrat éthéré 2. La même opération a permis d'obtenir le filtrat éthéré 3. Ces 3 filtrats ont été regroupés et concentrés sous vide à 50 ml. L'extrait obtenu est appelé extrait étherique. Après épuisement à l'éther de pétrole, le marc résiduel à été séché.

a) Caractérisation des alcaloïdes bases

On évapore 10 ml de la solution étherique et dissout le résidu obtenu dans 1.5 ml de HCl (2%), la formation d'un précipité blanc jaunâtre après l'ajout de 1 à 3 gouttes de réactif de Mayer à la solution aqueuse indique la présence des alcaloïdes bases.

b) Caractérisation des emodols

On évapore 3 ml de l'extrait étherique et on ajoute 1 ml d'NH₄OH concentré. L'apparition d'une teinte vive variant de l'orangé rouge au violet pourpre, indique la présence des emodols.

c) Coumarines

Evaporer 3 ml de l'extrait étherique. Le résidu est traité avec 1-2ml d'eau à chaud. Diviser le volume en deux 0.5ml est traité avec NH_4OH (10%) et l'autre sert comme un témoin. L'apparition d'une fluorescence intense UV ($\lambda = 265\text{nm}$) indique la présence des coumarines.

d) Caractérisation des stérols et triterpènes

Evaporer 5 ml de l'extrait étherique. Le résidu obtenu est dissout dans 1 ml d'anhydride acétique puis 1 ml de chloroforme. Le mélange est partagé dans deux tubes à essai. L'un servant de témoin et dans le fond du second et à l'aide d'une pipette 1 à 2ml de H_2SO_4 concentré sont rajoutés. A la zone de contact des deux liquide-t-il ya formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet la couche surnageant devenant verte (présence des hétérosides stéroliques) ou violette (présence des hétérosides triterpeniques).

e) Terpénoides

Mélanger 5 ml de l'extrait entérique avec 2ml de chloroforme et 3ml d'acide sulfurique concentré. L'apparition d'une coloration rouge-marronne à la couche d'interface indique la présence des triterpènes hétérosidiques.

f) Quinones libres

à 10 ml de l'extrait étudié sont ajoutées quelques gouttes de NaOH 0.1N. La présence des quinones libres est confirmée si la phase aqueuse vire au jaune, rouge ou violet.

g) Acides gras

Evaporer 14 ml de solution étherique, le résidu ainsi obtenu est dissout dans l'éthanol. La solution éthanolique obtenue est ensuite concentrée à sec. Le résidu est saponifié en ajoutant 10 ml de KOH 2N. Extraire le mélange avec de l'éther diéthylique. Après évaporation à sec, l'obtention d'un résidu gras indique la présence des acides gras.

III .Extraction avec le méthanol

La poudre issue après extraction avec l'éther de pétrole est épuisée avec 60 ml de méthanol. Après 30 min d'agitation à température ambiante, le mélange est filtré et conduit au filtrat méthanolique 1. La même opération a été reprise et donne le filtrat

méthanolique 2. Les 2 filtrat méthanoliques réunis ont été filtrés et concentrés sous vide à 50 ml.

a) Alcaloïdes sels

Evaporer 20 ml de l'extrait a sec. Ajouter 5 ml d'HCl 2N au résidu et chauffer dans un bain marie .filtrer le mélange puis diviser le filtrat en deux partieségales. Traiter la première avec quelques gouttes du réactif de **Mayer** et la seconde avec le réactif de **Wagner**.

Dans le cas du réactif de Mayer on obtient une turbidité + précipite blanc-jaunâtre et pour celui de Wagner turbidité + précipite brun.

b) Tannins

A 1ml de solution à tester ajouter 2ml d'eau et 2 à 3 gouttes de solution de FeCl₃ à 2% laissé reposer quelques minutes. Un test positif est révèle par l'apparition d'une coloration bleu foncé (présence des tannins galliques) ou une coloration verte (présence des tannins cathéchiques).

c) Composé réducteurs

On traite 1 ml de la solution méthanolique avec 2ml d'eau et 20 gouttes de liqueur de Fehling, après un chauffage, l'apparition d'un précipité rouge brique marque la présence des hydrates de carbones.

d) Flavonoïdes

Traiter 5ml d'extrait avec quelques gouttes d' HCl concentré et 0.5g de tournures de magnésium (laisser agir).la présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge ou violet se développe en l'espace de 3mn.

e) Caractérisation des anthracénosides

On prendre 25 ml de l'extrait éthanolique et on ajoute 15 ml d'HCl 10%, puis on le porte à reflux pendant 30 mn. Après refroidissement, on extrait la solution 3 fois avec 15 ml d'éther diéthylique afin d'obtenir deux phases, aqueuse et étherique.

Le test de la présence des anthracénosides est basé sur la réaction de Bortrager. Dans le quel on évapore 8 ml de la phase étherique et récupérer le résidu avec 2 ml d'eau chaude, on ajoute quelques gouttes d'NH₄OH à 10%. Le test considéré positif par l'apparition d'une coloration rouge orangée.

f) Coumarines

Evaporer 5ml de l'extrait.Le résidu est traité avec 1-2ml d'eau à chaud. Deviser le volume en deux 0.5ml est traité avec NH₄OH (10%) et l'autre sert comme un

témoin. L'apparition d'une fluorescence intense UV ($\lambda = 265\text{nm}$ ou 365nm) indique la présence des coumarines.

g) Hétérosides stéroliques et triterpéniques

Evaporer 10ml de l'extrait. Le résidu obtenu avec 0.5ml de chloroforme et 0.5ml d'anhydride acétique. Le mélange est partagé dans deux tubes à essai. L'un servant de témoin et dans le fond du second et à l'aide d'une pipette 1 à 2ml de H_2SO_4 concentré sont rajoutés. A la zone de contact des deux liquide-t-il ya formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet la couche surnageant devenant verte (présence des hétérosides stéroliques) ou violette (présence des hétérosides triterpéniques).

h) Caractérisation des anthocyanosides

On dose la phase aqueuse obtenu avec le NaOH. Un virage de couleur à pH différent indique la présence des anthocyanosides (l'apparition d'une couleur rouge à $\text{pH} < 3$ et bleu entre 4 et 6, caractérise les anthocyanosides).

Annexe 3**Milieux de culture et réactifs****Milieu PDA (Potatoes Dextrose Agar)**

Pomme de terre (macération 500ml de filtrat)	200 g
Sucrose	10 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

Milieu MEA (Malt Extract Agar)

Matière Sèche	50 g
Agar	5 g
Eau distillée	1000 ml

Milieu YES (Yeast Extract Sucrose)

Extrait de Levure	20 g
Sucrose	40 g
Eau distillée	1000 ml

Czapek Concentre

NaNO ₃	30 g
KCL	5 g
MgSO ₄	5 g
FeSO ₄	0.1 g
Eau distillée	100 ml

Milieu CYA (Czapek Yeast Agar)

Czapek Concentre	10 ml
KH ₂ PO ₄	1 g
Extrait de levure	5 g
Sucrose	30 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

Milieu G25N (25 % Glycérol Nitrate Agar)

Czapek Concentre	7.5 ml
KH ₂ PO ₄	0.75 g
Extrait de levure	3.7 g
glycerol	250 g
Agar	12 g
Eau distillée	750 ml

Milieu CDA (CzapekDox Agar)

Sucrose	30 g
KH ₂ PO ₄	1 g
KCL	0.5 g
MgSO ₄	0.5 g
FeSO ₄	0.01 g
NaNO ₃	3 g
Agar	15 g
Eau Distillée	1000 ml

Milieu SNA (Synthetic Nutrient-poor Agar)

Sucrose	0.2 g
glucose	0.2 g
KNO ₃	1g
KH ₂ PO ₄	1 g
KCL	0.5 g
MgSO ₄	0.5 g
Agar	15 g
Eau Distillée	1000 ml

Milieu SFA

Extrait de levure	1 g
glucose	20 g
NaNO ₃	2 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
FeSO ₄	1 ml
MgSO ₄	0.5 g
Agar	15 g
Eau Distillée	1000 ml

Gélose Mueller Hinton

Infusion de viande de boeuf	4,0
Hydrolysate de caseine	17,5
Amidon	1,5
Agar	15,0
Eau Distillée	1000 ml

Suspendre 38g de la poudre dans un litre d'eau distillée ensuite chauffer sous agitation jusqu'à ébullition pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121°C pendant 15 min.

Gélose Nutritive

Infusion de viande de boeuf	1,0
Extrait de levure	2,0
Peptone	5,0
Chlorure de sodium	5,0
Agar	15,0
Eau Distillée	1000 ml

Suspendre 28 g de la poudre dans un litre d'eau distillée ensuite chauffer sous agitation jusqu'à ébullition pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121°C pendant 15 min.

Bouillon Nutritif

Extrait de viande	3,0
Peptone	5,0
Chlorure de sodium	5,0
Eau Distillée	1000 ml

Suspendre 13g de la poudre dans un litre d'eau distillée, ensuite stériliser par autoclavage à 121°C pendant 15 min.

Eau physiologique

NaCl	9 g
Eau distillée	1000 ml

Annexe 4

Identification des bactéries

L'identification des bactéries se fait suivant une clé dichotomique qui va des caractères les plus vastes aux plus pointus pour aboutir à une espèce bactérienne donnée. Cette identification se fait selon des critères morphologiques par ensemble des techniques :

État frais

L'état frais se fera avec une goutte de suspension entre lame et lamelle. Cette observation microscopique se fera à l'objectif x40 avec peu de lumière pour ne pas tuer les bactéries car le but de cette observation est de voir leurs mobilités.

- **Coloration de Gram**

Elle nécessite d'avoir un frottis fixé : sur une lame, déposer une goutte d'eau stérile. Ajouter à la goutte une colonie isolée. Étaler et fixer à la chaleur d'une platine à environ 40°C. Une fois sèche, poser la lame séchée sur le portoir reposant sur un bac de coloration.

Puis la succintement les différentes étapes de cette coloration :

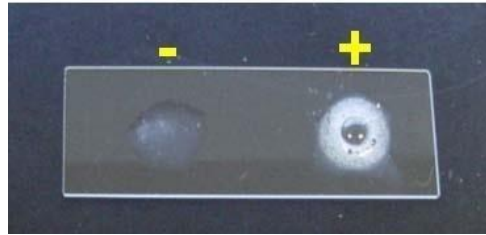
- I. Coloration par le violet de gentiane ou cristal violet. Laissez agir de 30 secondes à 1 minute, puis rincez à l'eau
- II. Mordançage au Lugol (solution d'iode iodo-iodurée) : étalez le lugol et laissez agir le même temps que le violet de gentiane ; rincez à l'eau déminéralisée.
- III. Décoloration (rapide) à l'alcool
- IV. Recoloration à la safranine ou à la fuchsine. Mettez de l'eau distillée sur la lame et quelques gouttes de Fuchsine. Laissez agir de 30 secondes à 1 minute. Lavez doucement à l'eau déminéralisée. Séchez la lame sur une platine chauffante à 50°C.
- V. Observez avec une goutte d'huile à immersion objectif 100 (grossissement $\times 1000$).

Si la couleur des bactéries est violette, on dit que la bactérie est Gram +

Si la couleur des bactéries est rose, on dit que la bactérie est Gram –

- **Recherche de la catalase**

La Catalase est une enzyme qui catalyse l'hydrolyse d'eau oxygénée avec dégagement d'oxygène. Déposer une goutte de H₂O₂ sur une colonie isolée, Si des bulles se forment, la bactérie possède la catalase. Si rien n'est observable, la bactérie ne possède pas l'enzyme



Test de catalase

- **Identification par plaque API 20**

- ❖ **Présentation de la galerie API**

Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 mL d'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.

Inscrire les références de la souche bactérienne sur la languette latérale de la boîte (+ date et initiales de l'opérateur). Déposer la galerie dans la boîte d'incubation.

- ❖ **Présentation de l'inoculum**

- * Ouvrir une ampoule de « Suspension Medium » ou introduire quelques ml d'eau distillée stérile (avec une pipette Pasteur) dans un tube à vis stérile.

- * Avec la pipette Pasteur, prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé.

- * Réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu.

- ❖ **Inoculation de la galerie API 20E**

- * Avec la suspension bactérienne et la pipette ayant servi au prélèvement, remplir tubes et cupules des tests CTI, VP, GEL

- * Remplir uniquement les tubes (et non les cupules) des autres tests.

- * Créer une anaérobiose dans les tests ADH, LCD, ODC, URE, H₂S en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.

- * Refermer la boîte d'incubation et la placer dans l'étuve à 35 - 37° C pendant 18 à 24 heures.

Annexe 5



(a)



(b)



(d)(e)

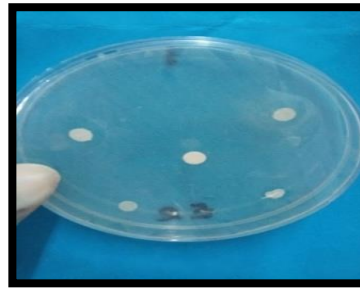


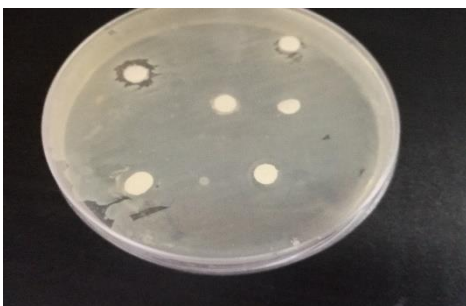
Photo de l'effet inhibiteur de l'extrait aqueux d'*E.alata* obtenu avec montage sous reflux sur (a) *Bacillus subtilis* (b) *Bacillus cereus*, (c) *Enterococcus faecalis* et (d) *Citrobacter freundii*



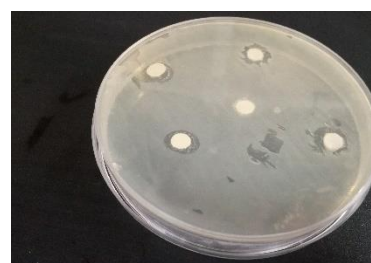
(a)



(b)



(c)



(d)

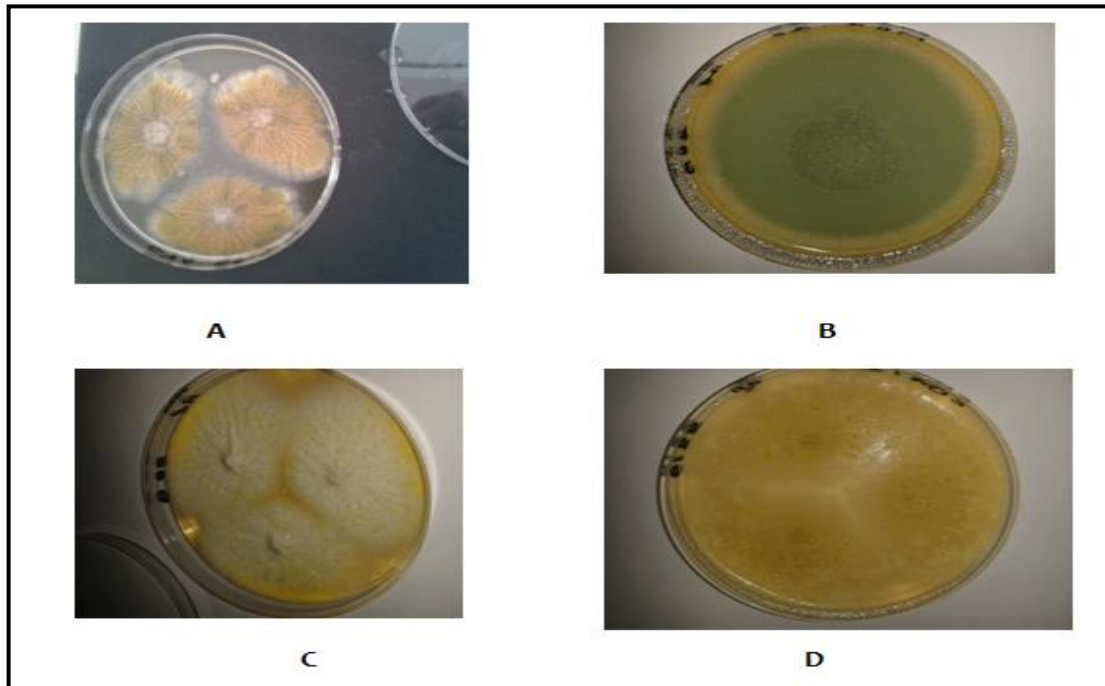
Photo de l'effet inhibiteur de fraction aqueuse d'*E.alata* sur (a) *Bacillus subtilis* (b) *Salmonella typhimurium*, (c) *Staphylococcus aureus* et (d) *Enterococcus faecalis*

Annexe 6

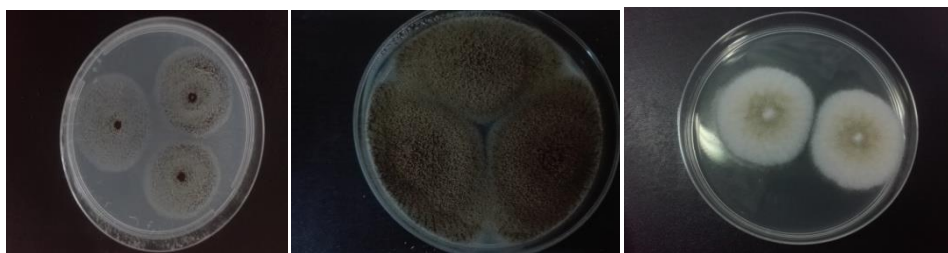
Identification des souches fongiques

Les résultats des techniques d'identification des souches fongiques étudiées sont résumés dans le tableau suivant :

		Lecture	
Genres /Espèces	Milieu	Couleur	Diamètre en mm
<i>Aspergillus flavus</i>	MEA 25°C	Vert/reverse Jaune orangé	84
	CYA 37°C	marron foncé	52
	CYA 5°C	/	0 Germination
	G25N 25°C	Centre blanc cassé bord Jaune/reverse orange	45
	CDA 25°C	Jaunâtre /reverse orange	45
<i>Aspergillus niger</i>	MEA 25°C	Brun-noir à bordure blanche	64
	CYA 37°C	Noir	37
	G25N 25°C	Jaune	45
<i>Aspergillus ochraceus</i>	MEA 25°C	Jaune doré	32
	CYA 37°C	jaune foncé	27
	G25N 25°C	Blanc	23

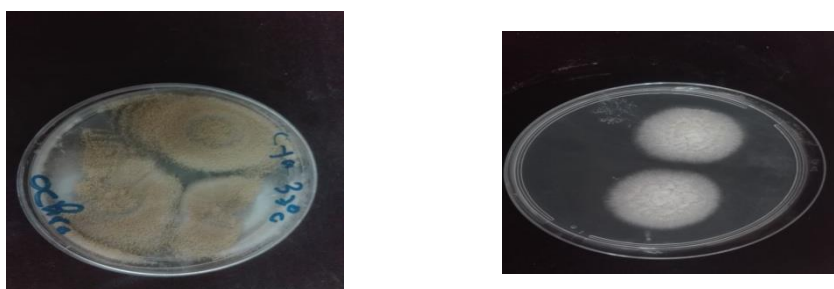


Aspergillus flavus par méthode de single spore A : sur milieu CYA à 37°C, B : sur milieu MEA à 25°C, C : sur milieu G25N à 25°C, D : sur milieu CDA à 25°C.



A B C

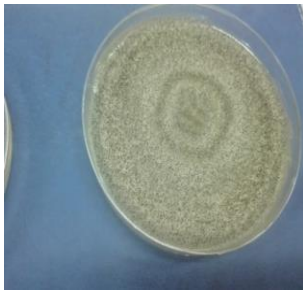
Aspergillus niger par méthode de single spore A : sur milieu MEA à 25°C, B : sur milieu CYA à 37°C, C : sur milieu G25N à 25°C.



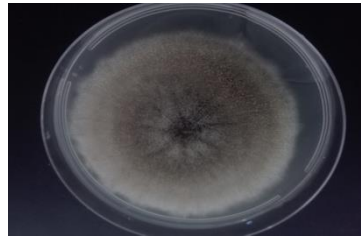
A B

Aspergillus ochrasus par méthode de single spore A : sur milieu CYA à 37°C, B : sur G25N à 25°C.

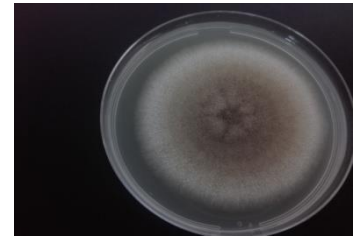
Annexe 7



Témoin



0.25 mg/ml



0,375 mg/ml

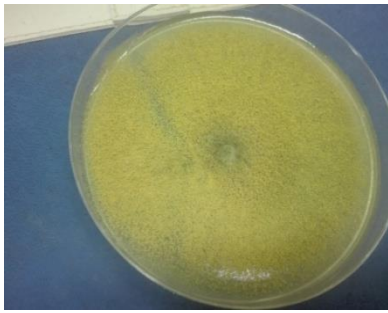


0,5mg/ml

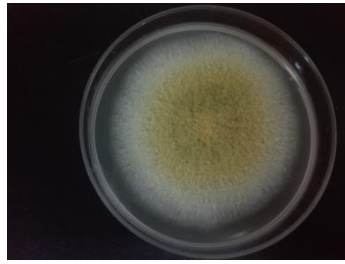


0.75 mg/ml

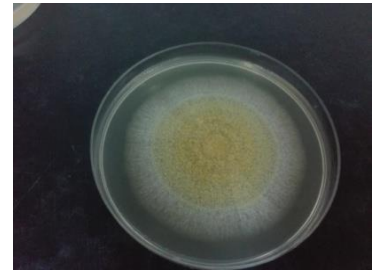
Spécimens de la croissance radiale de la souche Aspergillus niger sous l'effet des différentes concentrations de l'extrait d'alcaloïdes d'E.alata.



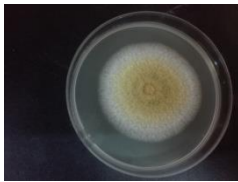
Témoin



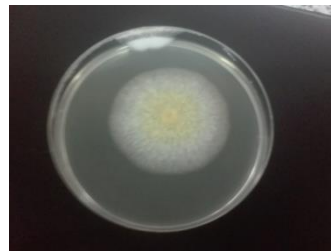
0.25 mg/ml



0,375 mg/ml

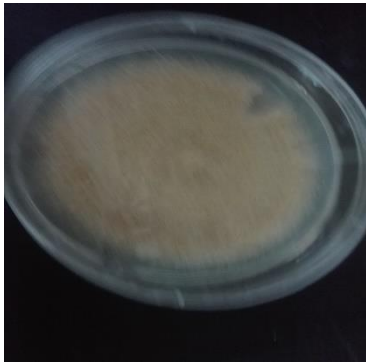


0,5mg/ml

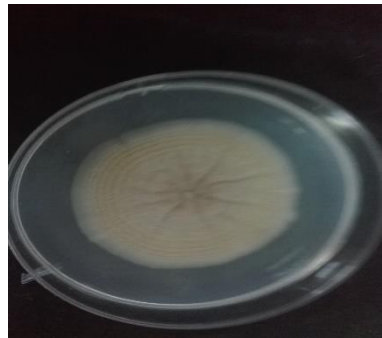


0.75 mg/ml

Spécimens de la croissance radiale de la souche Aspergillus flavus sous l'effet des différentes concentrations de l'extrait d'alcaloïdes d'E.alata.



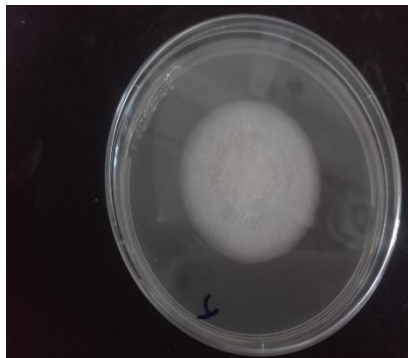
Témoin



0.25 mg/ml



0,375 mg/ml



0,5mg/ml



0.75 mg/ml

Spécimens de la croissance radiale de la souche Aspergillus ochrasussous l'effet des différentes concentrations de l'extrait d'alcaloïdes d'E.alata.

**REGULAR ARTICLE**

Ethnobotanical, phytochemical characterization and biological activities of *Ephedra alata* Decne extracts, growing wild in Bechar region, south west of Algeria

Z. Hibi^{1,2}, A. Makhloufi², R. Azzi¹

¹Antibiotics Antifungal Laboratory, Physical Chemistry, Synthesis and Biological Activity (LAPSAB), Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Tlemcen, BP 119, 13000 Tlemcen, Algeria

²Laboratory Of Valorization Of Vegetal Resource And Food Security In Semi Arid Areas, South West Of Algeria, BP 417, University Tahri Mohamed, Bechar, Algeria

ARTICLE INFO**Article History:**

Received: 26 Sep 2021

Revised: 15 Dec 2021

Accepted: 1 Jan 2022

***Corresponding Author:**

Email: zineb.hibi@univ-tlemcen.dz

Telephone: 0663406164

Keywords: *Ephedra alata*, crude extracts, antioxidant activity, antimicrobial activity, ethnobotanical study, Bechar

ABSTRACT

The increased resistance of microorganisms to antibiotics is a serious global problem that has guided research for the identification of new biomolecules with broad antibacterial activity. *Ephedra alata* has been the object of several researches due to its multiple uses, it known to possess antibacterial and antifungal properties. This study aimed to evaluate the ethnobotanical informations related to the use of *E. alata* Decne for medicinal purposes, and investigating the antimicrobial, antioxidant effects of this plant which is widely used in traditional therapy. The ethnobotanical study of *E. alata* Decne in Bechar region is done by using a questionnaire to get an overview on various local traditional uses. Aqueous and alcoholic extracts of *E. alata* Decne were evaluated in vitro against some bacterial and fungal strains. Broth dilution methods, disc diffusion and minimum inhibitory concentration (MIC) determination methods were used to determine the antimicrobial activity of different plant extracts. The phytochemical screening shown that *E. alata* Decne is rich with Flavonoids, saponins and tannins. The evaluation of antimicrobial activity showed that the aqueous under reflux extraction have the best antibacterial activity with inhibition diameters of 20 mm against *Bacillus subtilis*. The aqueous extracts have significant activity against tested fungal strains; the inhibition percentage was 64, 44% on *Aspergillus ochrasus*. For the antioxidant capacities, the ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activities of the extracts showed a higher antioxidant activities. The results obtained in this study show the richness of *E. alata* with chemical substances and may represent a new potential source of bioactive compounds in therapy.

1. Introduction

Nowadays, the bacterial resistance of the available antimicrobial agents is becoming a growing problem. Therefore, several research projects are working on improving new antimicrobial agents that

could overcome the resistance (Georgopapadakou and Walsh, 1996; Mohanasundari et al., 2007). The value of medicinal plants in drug discovery is known to us well and the human being used them for various purposes from the beginning of human

history (Farnsworth,1990), Plants possess antimicrobial and antioxidants properties due to the presence of a wide variety of secondary metabolites, such as tannins, terpenoids, alkaloids, flavonoids, etc (Cowan,1999). *E. alata* medicinal plant belonging to the Ephedraceae family is a genus of non-flowering seed plants belonging to the Gnetales, the closest living relative of the Angiosperms (Friedman, 1996). *Ephedra* has been used for more than 5000 years in traditional Chinese medicine to treat allergies, bronchial asthma, chills, colds, coughs, edema, fever, flu, headaches, common cold and nasal congestion and has been a natural product (Rustaiyan et al., 2011). The native land for this species is Iran, Algeria, Iraq, Chad, Egypt, Palestine, Lebanon, Jordan, Saudi Arabia, Morocco, Syrian Arab Republic, Libya, Mauritania, Mali, Somalia and Tunisia (Abourashed et al., 2003).

Previous research has found that aqueous extracts from this plant exhibit anticancer properties in vitro, which have induced, reducing proliferation with invasive tendencies, causing the induction of cell cycle arrest, and suppressing tumorangiogenesis (Shukla and Mehta, 2015). It has also been demonstrated to have antiinflammatory, antibacterial, antioxidant, antidiabetic, antiobesity and antiviral effects (Hyuga et al., 2016). Moreover, the decoction of the aerial parts of *E. alata* has an anti-diabetogenic activity in vitro and in vivo (Lamine et al., 2019). Health beneficial effects of *E. alata* plant extracts are by dint of the presence of pharmacologically active substances, like alkaloids, phenolic acids, flavonoids, proanthocyanidins, tannins, saponins reducing sugars and cardiac glycosides (Ibragic and Sofic, 2015; Sioud et al., 2020). The current work aims to characterize the phytochemical contents of *E. alata* and to evaluate the antibacterial, antifungal and antioxidant activity of *E. alata* (aqueous and alcoholic extracts) grown in Bechar region

2. Materials and methods

E. alata aerial parts were collected in January 2017 from Béni Abbes region (figure 01). The plant was washed and then dried in the shade at room temperature away from the sunlight until all the plant parts became well dried. After drying, the plant materials were then powdered well by using a grinder and placed into a well-closed container away from light, heat, and moisture.

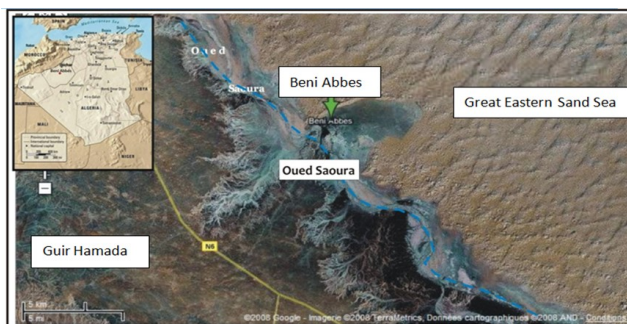


Figure 1: Geographical situation of the study area (Merzougui et al., 2008).

2.1 Ethnobotanical survey

A survey was conducted in Bechar area, with 500 persons interviewed (272 men and 228 women), their age ranged from 17 to 82. Each interview followed a questionnaire aimed at obtaining the following information: age, sex, cultural level, way in which they acquired knowledge about the medicinal plant, part of the plant being used, form of use and mode of preparation.

2.2 Phytochemical screening

Qualitative phytochemical analysis of the crude powder of the plant was determined by proven methods (Edeoga, 2005; Jigna and Sumitra, 2007). The presence of tannins was estimated by using 200 mg of plant material that was dissolved in 10 ml of distilled water, and then filtered. 2 ml of the filtrate was taken and 2 ml iron (III) chloride solution added. A blue-black precipitate indicated the presence of tannins. For the presence of alkaloids 200 mg plant extract was dissolved in 10 ml methanol, and filtered. 1 ml of filtrate was combined with 6 drops of Wagner's reagent (made by combining 1.27 g of iodine with 2 g of potassium iodide in 100 ml of water). A creamish/brownish-red/orange precipitate indicated the presence of alkaloids. The presence of saponins was determined by the frothing test method (Jigna and Sumitra, 2007), in which 0.5 ml of filtrate was mixed with 5 ml of distilled water. Frothing persistence indicated presence of saponins. The presence of cardiac glycosides was determined by the Keller-Kiliani test (Hussain et al., 2011) in which 2 ml of the filtrate was combined with 1 ml of glacial acetic acid and three drops of Iron (III) chloride and concentrated sulphuric acid. The color green-blue shows the presence of cardiac glycosides. Terpenoids presence was determined by taking 5mls of the plant extract that was mixed with 2mls of chloroform, and 3mls of concentrated sulphuric acid was then carefully

added to form a layer. If a reddish brown coloration of the interface formed, it indicated the presence of terpenoids. Flavonoids presence was determined by taking 5 ml of dilute ammonia solution that was added to a portion of the aqueous filtrate of each plant extract followed by the addition of concentrated sulphuric acid. A yellow coloration observed in each extract indicated the presence of flavonoids. The yellow coloration disappeared on standing.

2.3 Preparations of plant extract

2.3.1 Aqueous extracts

Maceration: ten grams of plant powder were macerated for 24 h in 100 ml of distilled water at room temperature. The macerate obtained was filtered to remove insoluble residues. Subsequently, the filtrate was condensed by evaporation, using a rotary evaporator at 75 ° C, in order to eliminate the remaining solvent.

Under reflux: ten grams of powdered plant material were mixed with 100 ml of distilled water in a round bottom flask and refluxed for 1 hour. The mixture was then filtered using a filter paper. Water was removed from the filtrate by evaporation using a rotary evaporator at 75 ° C

2.3.2 Alcoholic extract

Ten grams of plant powder were put in 100 ml of methanol or ethyl acetate and refluxed for 1 hour. The extract is filtered and dried at 65 ° C.

2.4 Biological activities

2.4.1 Antibacterial activity

Bacterial strains used in this study were *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Bacillus cereus* ATCC11778; *Bacillus subtilis* ATCC 6633; *Citrobacter freundii* ATCC 8090; *Escherichia coli* ATCC 259.

To evaluate antibacterial activity, two methods, recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) were used; the disk diffusion method and the microdilution method.

2.4.1.1 The disk diffusion method

The evaluation of antibacterial activity was carried out by the disk diffusion method. Whatman filter paper was used to prepare discs of 6 mm in diameter. Discs were sterilized by autoclaving. They were

then are soaked with 20 µl of each extract dissolved in DMSO (Harbone, 1984).

A bacterial suspension adjusted to 0.5 McFarland standard was used to inoculate Mueller Hinton agar plates evenly using a sterile swab. The discs impregnated with the plant extracts were placed on the Mueller Hinton agar surface. The plate was then incubated at 37°C for 18 hours. Zones of inhibitions produced by the sensitive organisms were demarcated by circular area around the discs. The diameter of the zone of inhibition through the center of the disc was measured to the millimeter (Bauer et al., 1966).

2.4.1.2 Determination of minimum inhibitory concentration

The technique used was described by CLSI in 2006. It is based on the ability of microorganisms to produce growth visible to the unaided eye within a series of dilutions of the antimicrobial substance (CLSI, 2006).

For each line of the microplate, we deposited 50µl of test medium in the 12 wells except well N°1 and N°12. The first well was used as a negative control; it was inoculated with the broth to check the sterility of the media (100µl), and, the last well was used as a positive control and was inoculated with the inoculum suspension (100µl). We then added 50µl of the extract to be tested in wells N°2 from well N° 1.

After thoroughly mixing the contents of the second well, we took 50µl and put it in the third well, then from the third to the fourth and so on to the last well in order to obtain successive dilutions from half to half. The remaining 50µl of the last well must be removed. Finally, we introduced 50µl of inoculum into each well from 2 to 11. Well N°11 will serve as a positive control (growth without extract)

The plates are placed at 37°C for 24 hours. The result is read with the unaided eye. The lowest concentration of each fraction showing no growth will be considered as the minimum inhibitory concentration (MIC).

2.4.2 Moulds activity

The antifungal activity was tested by radial growth. Test fungi included *Aspergillus Niger*, *Aspergillus ochrasus* and *Aspergillus flavus*. Fungi strains were maintained in potato dextrose agar and incubated at 25°C for 7 days.

Using a pasteur pipette and from a 7 day culture, the spores of the tested strain were placed in a semi-solid suspension based on 0.2% agar and 0.05 tween 80.

Moulds activity was determined according to Dixit et al. (1996) to add 1ml from extracts to potato dextrose agar media. Then, using a platinum handle, a drop of the prepared sporal suspension is placed in the center of each dish. The dishes were incubated at 25°C for 7 days with a control sample without extracts.

The percentage of growth inhibition (PIc) due to each crude extract is evaluated in relation to mycelial growth in the control boxes according to the following formula (Harbone, 1984).

$$PIc = \frac{DT - D}{DT} \times 100$$

Where:

PIc: Percentage of mycelial growth inhibition.

DT: the diameter of mycelial growth on the control.

D: the diameter of mycelial growth in the presence of test extract.

2.4.3 Antioxidant activities

2.4.3.1 Determination of DPPH free radical scavenging activity

The electron donation abilities of the corresponding extracts and some pure compounds were measured from the bleaching of the purple-colored methanol solution of 2,20-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) (Burits and Bucar, 2000). Each methanolic extract or a standard was dissolved with methanol and prepared at various concentrations ranging from 0.50 to 0.03125 mg/ml sample solutions. 100 µl of 1: 5 concentrations of extracts in methanol were added to 1.9 ml of a 0.004% methanol solution of DPPH. After a 30 min incubation period at room temperature, the absorbance was read against a blank at 517 nm. Inhibition of free radical by DPPH in percent (I %) was calculated in following way:

$$I \% = (A \text{ blank} - A \text{ sample} / A \text{ blank}) \times 100;$$

Where A blank is the absorbance of the control reaction (containing all reagents except the test compound), and A sample is the absorbance of the test compound. Tests were carried out in triplicate

2.4.3.2 Determination of ferric reducing power of extracts

The reducing power of each extract or the standards was determined according to the method of Oyaizu (1986). One milliliter of each extract or the standard solution prepared with 70% methanol at various concentrations ranging from 0.05 to 0.5 mg/mL was mixed with 2.5 ml of 0.2 M potassium phosphate buffer (0.2 M and pH 6.6) and 2.5 ml of 1% potassium ferricyanide and the mixture was incubated at 50 °C for 20 min.

Then, 2.5 ml of 10% trichloroacetic acid was added, and the mixture was centrifuged for 10 min. A 2.5 ml amount of the upper layer was mixed with 2.5 ml of deionized water and 0.5 ml of 0.1% ferric chloride, and the absorbance was read at 700 nm against the blank. Samples were analyzed in triplicate.

3. Results

3.1 Ethnobotanical survey

The age distribution of informants showed that the most dominant of informants in our study were between 17 to 82 ages. In terms of educational attainment, the secondary level is more common than the other levels.

According to the ethnobotanical survey findings, the importance of the plant seems to be underestimated by the population, 46.6 % absolutely ignore the plant and 24.6 %, even if they know the plant's name, they have no idea of its use in traditional medicine. The minority of people who know one or more of the plant's medicinal uses are averaging 56.7 years of age. In reality, Benkhniue et al. (2011) observed that older people have greater knowledge of medicinal plants than other age groups. In Hammoudi's study (2015), 41-60 years of age are also those who use the most plants. The use of this plant varies according to sex; women use it a lot than men. Another result is that the vast majority of illiterate survey participants know the plant and at least one of its uses.

52% of the respondents who know the plant refer to the experiences of the others. This reflects the image of the relative transmission of traditional practices from one generation to the next. 37% of the respondents refer to herbalists and 11% refer to themselves either by consulting the books of traditional medicine or by following the television programs or by using the internet.

Most of the respondents agree with the use of *Ephedra*, and especially in the case of cancer and problems of the respiratory system. *E. alata* is used against influenza, cough and rheumatism. According to our survey, we list some applications of this plant according to the utilization rate (Figure 2).

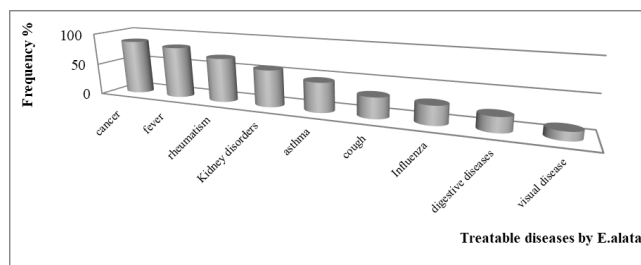


Figure 2: Frequency of treatable diseases by *E.alata*.

Plus, various parts of the plant are used for medicinal preparations (bark, root, stem, leaves, fruits, seeds, leafy branches, and tuber). For *E. alata* all our respondents agree that the most widely used part is the aerial part consisting of stems and tiny leaves.

Another result, decocté (72.97%) is the most used drug form, followed by powder (16.24%), Fumigation (6.37%) and poultice (4.42%). 95.58% of the respondents use *E.alata* with inaccurate doses, including 8.8% per pinch, 26.20% per spoon and 50.12% per handle.

3.2 Phytochemical screening

The results of the phytochemical tests carried out on *E. alata* grouped in Table 1; show the presence of:

- Flavonoids, flavonoids are ubiquitous in photosynthesizing cells and therefore occur widely in plant kingdom (Havsteen, 1983). The antibacterial activity of flavonoids has been documented in several earlier studies (Süzgeç-Selçuka and Birteksöz, 2011; Liu et al., 2010). Flavonoids have multiple cellular targets and may act as nucleic acid synthesis, cytoplasmic membrane function, or energy metabolism inhibitor. Also, flavonoids are bacteriostatic compounds (Cushnie and Lamb, 2005) and play a major role as antioxidants and in cell signalling pathways. They also have anti-allergic, anti-inflammatory, anti-cancer and anti-viral properties.
- Tannins, According to Iserin (2001), tannins are phenolic compound which act as primary antioxidants or free radical scavengers.

- Steroids, steroids have been reported to have antibacterial properties, the correlation between membrane lipids and sensitivity for steroidal compound indicates the mechanism in which steroids specifically associate with membrane lipid and exerts its action by causing leakages from liposomes.
- Alkaloids that have numerous therapeutic effects, some are used in medicine for their analgesic properties, or as anticancer agents (taxol, vinblastine). They also have neuropharmacological activity, cytotoxic activity and antioxidant activity
- Saponins, saponins protect against hypercholesterolemia and antibiotic properties. Saponins which are one of the active constituents involved in plant disease resistance because of their antimicrobial activity (Barile et al., 2007).
- Fatty acids, that have anti-inflammatory, antiplatelet, vasoconstriction reduction (Bruno and Agnès, 2015) and play a role in the prevention of diabetes and certain types of cancer (Lunn and Theobald, 2006)
- Reducing agents, which may be the reason for its high antioxidant effect (Celiktaş et al., 2007). And it contains triterpenes that are frequently encountered in nature in a glycoside form called saponin and responsible for a multitude of therapeutic and biological activities (cytostatic, antiviral, insecticide, anti-inflammatory, molluscicide, analgesic) (Bruneton, 1999).

Chemical constituent	Results of chemical reaction
Emodols	-
Coumarins	-
Sterols	-
Steroids	+
triterpenes	+
Terpenoids	-
Quinone	-
fatty acids	+
alkaloids	+
reducing agents	+
Flavonoids	+
polysaccharides	+
Anthocyanin	-
Tanins	+
Saponins	+

Table 1: Phytochemical test.

Where; Key: + indicate presence and – indicate absence

- Polysaccharides, which have immunomodulatory and immunostimulating properties, anti-tumor and antiviral activities (Delattre et al., 2005)

These results are consistent with those of Kessal and Bouafia (2003) on the same species from the Ouargla region. The abundance of active ingredients gives the plant remarkable pharmacological properties.

3.3 Yields

Yield is expressed as a percentage of dry extract mass relative to plant mass. The results obtained show that the yields of the refluxed aqueous extract are slightly higher than the aqueous extracts obtained by maceration and that the yields of the aqueous extracts are higher than the methanolic and ethyl acetate extracts (Table 2).

ex-tracts	meth-anolic	Ethyl acetate	Aqueous (macera-tion)	Aqueous (reflux)
<i>E. alata</i>	8.24%	9.14%	16.08%	17.27%

Table 2: Yields of methanolic and aqueous extracts of *E. alata*.

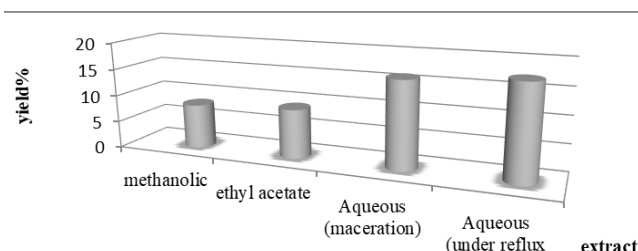


Figure 3: Yields of methanolic, ethyl acetate and aqueous extracts of *E. alata*.

3.4 Biological activities

3.4.1 Antibacterial activity

Results of disc diffusion test (table 4) showed that the methanolic extract shows a moderate effect with a zone of inhibition of 9 mm against *Staphylococcus aureus* and 8 mm against *Bacillus cereus* at 1mg / ml concentration. The ethyl acetate extract had no effect on any of the tested strains. On the other hand, the aqueous extract of the same plant obtained with maceration has a marked effect on certain bacterial strains and not on others. The highest effect marked by this extract at a 1mg / ml concentration is 14 mm against *Bacillus subtilis* followed by *Bacillus cereus* with a zone of inhibition of 8 mm, for other strains (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*) we noticed any effect for the same extract.

For the aqueous extract obtained under reflux of *E. alata*, the highest effect is the one applied to *Bacillus subtilis* and who is translated by a 20 mm diameter followed by a diameter of 15 mm on *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* and diamètres of 12 mm on *Enterococcus faecalis* with a concentration of 1mg / ml. 10 mm diameter obtained with *Citrobacter freundii* and *Escherichia coli* by the same concentration symbolizes the lowest effects.

Led to the results presented in table 4 The MIC values for gram positives bacteria (1.3 µg/ml for *Bacillus subtilis*) were lower than those for gram negative bacteria (83.25 µg/ml for *Escherichia coli*). Also, gram positive bacteria are more sensitive to the extract than gram negative bacteria which may be

Extracts	Zone of inhibition (mm)						
	Gram positive bacteria				Gram negative bacteria		
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Escherichia coli</i>
Reflux	20 ± 1.7320508 SEM=1	15 ± 1.73205081 SEM=1	15 ± 1.73205081 SEM=0.57735027	12 ± 1.73205081 SEM=1	11 ± 1.73205081 SEM=0.57735027	10 ± 1.73205081 SEM=1	10 ± 1.73205081 SEM=0.57735027
Aqueous	14 ± 1.73205081 SEM=1	8 ± 1.73205081 SEM=0.57735027	6 ± 1.73205081 SEM=0	6 ± 1.73205081 SEM=0	6 ± 1.73205081 SEM=0	7 ± 1.73205081 SEM=1	6 ± 1.73205081 SEM=0
methanolic	6 ± 1.73205081 SEM=0	8 ± 1.73205081 SEM=0.57735027	9 ± 1.73205081 SEM=1	6 ± 1.73205081 SEM=0	6 ± 1.73205081 SEM=0	7 ± 1.73205081 SEM=0	6 ± 1.73205081 SEM=0
ethyl acetate	7 ± 1.73205081 SEM=0.57735027	6 ± 1.73205081 SEM=0	7 ± 1.73205081 SEM=0	6 ± 1.73205081 SEM=0	6 ± 1.73205081 SEM=0	6 ± 1.73205081 SEM=0	7 ± 1.73205081 SEM=1

Table 4: Zones of inhibition.

The inhibition zones are represented by the mean of the three trials ± standard deviation. with calculation of standard error of mean (SEM)

Concentration µg/ml	333	166.5	83.25	41.62	20.81	10.4	5.20	2.60	1.30	0.65
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Table 5: MIC values of the aqueous extract.

(+): growth (-): no growth

due to the presence of a capsule that makes gram negative bacteria more resistant.

On the basis of the results obtained in this investigation, we conclude that the aqueous extract have in vitro antimicrobial activity especially on Gram positive bacteria, but have mild activity in Gram negative bacteria, possibly because of the presence of outer membrane that serves as an effective barrier in Gram – negative bacteria which prevent penetration of plant extracts. However, not all action mechanisms work on specific targets, and some sites may be affected due to other mechanisms.

3.4.2 Antifungal Activity

A brief reading of the various graphic supports giving the effect of the extracts tested on the strains studied shows that, in general, the extracts had a variable antifungal effect on the strains tested. This effect was different from one extract to another and from one strain to another. In general, the aqueous extract had a stronger antifungal effect than the other extracts.

The results obtained show a more or less effective antifungal activity for the three extracts against the strains tested. The overall reading of the various results collected and recorded in the graphic supports shows a delay in mycelial growth proportional to the concentration of the extract added to the medium.

The results of the inhibition percentage of methanolic, ethyl acetate, aqueous under reflux extract and aqueous extracts of *E. alata* show that the aqueous extract exerts inhibitory activity on all mycelial strains tested with an inhibition percentage varying: 64,44% on *Aspergillus ochrasus*, 60 % on *Aspergillus flavus*, and 55.55% on *Aspergillus niger*.

These values are higher than those obtained with

aqueous under reflux extract for the three strains at a concentration of 0.75mg/ml.

In the presence of methanolic extract and ethyl acetate, no activity is noted on *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochrasus*.

According to these data, the order of effectiveness of the antifungal activity of these decreasing extracts can be classified as follows: aqueous extract > aqueous under reflux extract > methanolic extract > ethyl acetate extract, this difference can be at the origin of the different chemical composition between the four extracts.

In the presence of under reflux extract, no activity is noted on *Aspergillus ochrasus*.

The exploitation of the results of the antifungal activity of the various extracts of *E. alata* reveals that the intensity of this activity has been variable according to several factors, including the solvent used, the extraction method and the strain investigated.

A comparison of the growth inhibition of the crude extracts and their respective dilutions shows a strong dependent effect on extract concentrations. In general, the antifungal activity of extract dilutions is weaker compared to crude extracts. These results revealed that antifungal activity of the crude extracts was enhanced by increasing the concentration of the extracts, in effect; the inhibition activity of the extracts was concentration dependent. This finding is in agreement with the report of Banso et al. (1999), who also observed that higher concentrations of antimicrobial substances showed more growth inhibition.

In conclusion, due to the complexity of the chemical composition of the extracts, it is difficult to give a precise idea of their antifungal action. The possible mechanism by which mycelial growth can be

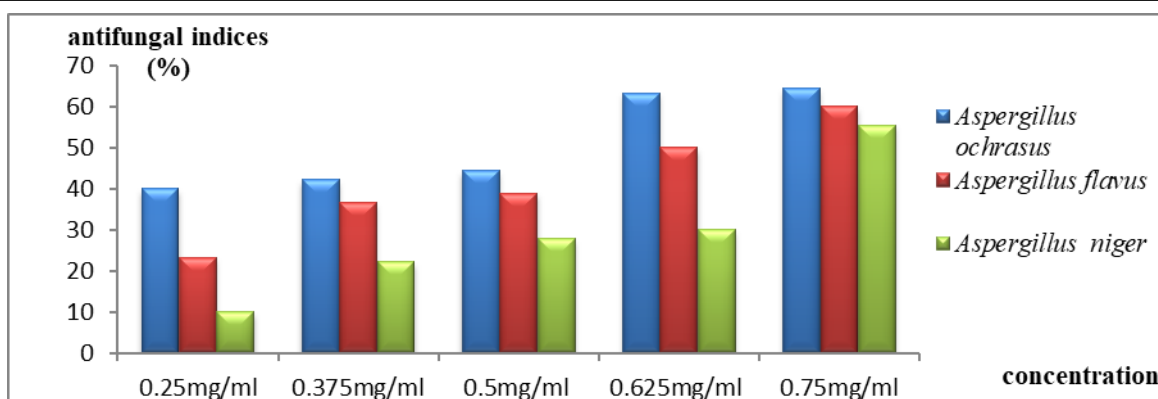


Figure 4: Antifungal indices of different concentrations of the aqueous extract of *E. alata* on *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochrasus*.

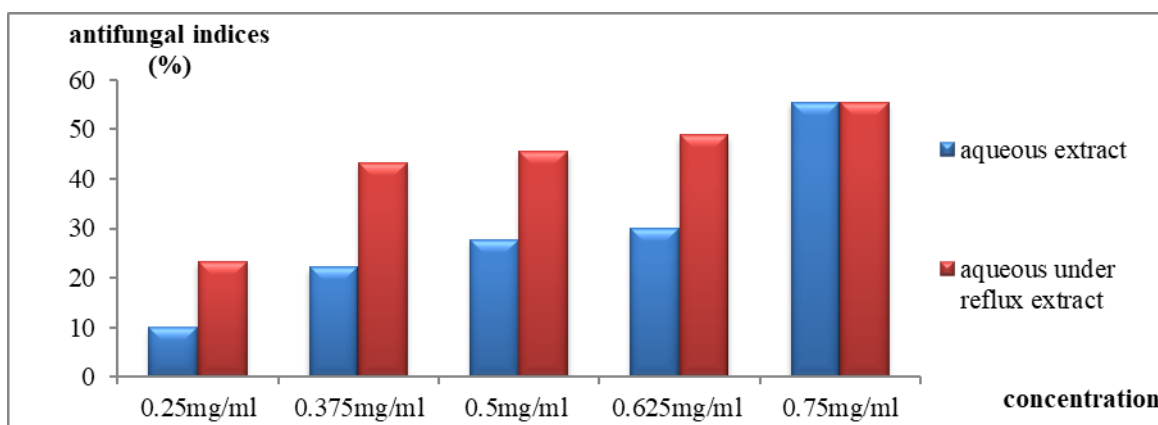


Figure 5: antifungal indices of different concentrations of the aqueous and aqueous under reflux extract of *E. alata* on *Aspergillus niger*.

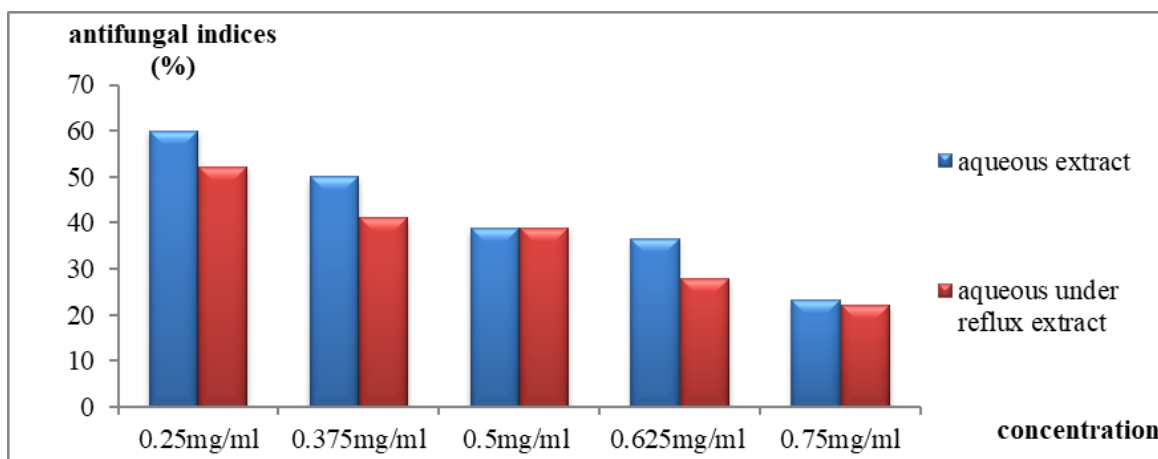


Figure 6: Antifungal indices of different concentrations of the aqueous and aqueous under reflux extract of *E. alata* on *Aspergillus flavus*.

reduced or totally inhibited by the effect of extracts by acting on the functionality and structure of the cell membrane (Sikkema et al., 1995). The components of extracts such as terpenes affect not only permeability but also other functions in cell membranes. These compounds can cross cell membranes, thus penetrating into the cell and interact with critical intracellular sites such as enzymes and proteins, leading to cell death (Omidbeygi et al., 2007; Cristani et al., 2007).

3.4.3 Antioxidant activities

3.4.3.1 DPPH radical scavenging activity

The antioxidant activity of *E. alata* extracts is manifested by the change in the color of the DPPH between the oxidized state (violet form) and the reduced state (yellow form), which makes it possible to quantify the percentage of inhibition of this radical by measuring the variations in absorbance at the different concentrations used. Virtually all ex-

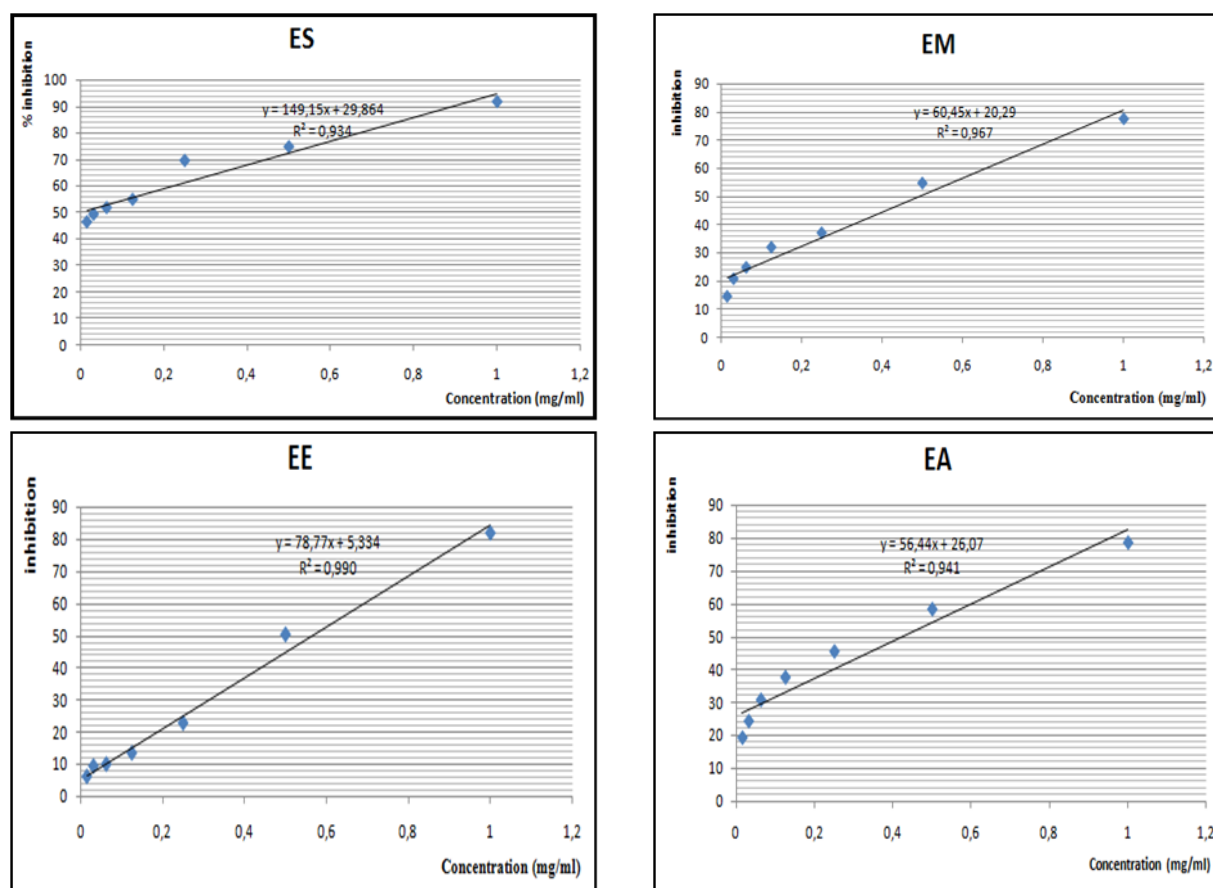


Figure 7: Antioxidant activity of the three extracts of *E. alata* and ascorbic acid (ES: ascorbic acid, EM: methanolic extract, EE: Ethyl acetate extract and EA: aqueous extract).

tracts reacted positively to anti-radical DPPH tests, this is due to the presence of an antioxidant.

It can be seen from Fig. 3 that the extracts prepared by methanol showed varying degrees of scavenging capacities. Also, the results showed that scavenging activity was increased with increasing concentration for all the extracts and positive controls. At all concentrations, Ethyl acetate extract showed higher scavenging activity than the others (82.08%) followed by aqueous extract (78.72%) and methanolic extract (77.72%).

In the present study, the ability of test materials (pure antioxidants and plant extracts) to scavenge DPPH was assessed on the bases of their IC₅₀ values, defined above as the concentration of test material to decrease the absorbance of DPPH solution to half of its initial value. These IC₅₀ values were obtained utilizing a calibration curve prepared by plotting percent inhibition values calculated by Eq. as a function of concentration of the test material. IC₅₀ values of methanolic extract, ethyl acetate extract and aqueous extract of *E. alata* are given in Table 6.

The close correlation between antioxidant activity

Extracts	IC ₅₀
EM	0.56
EE	0.42
EA	0.49
ES	0.13

Table 6: IC₅₀ values of *E. alata* extracts.

and phenolic content of extracts obtained from various natural sources has been demonstrated by many works (Parejo et al., 2002; Meyers et al., 2003). It was reported that the solvent used in extraction may also be important in the antioxidant activity of the extract, depending on the phenolic content.

3.4.3.2 Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

In reducing power assay, the yellow color of test solution changes to blue when adding reducers to the test solution medium. As a result of this, color change (formation of perl's Prussian blue) based on the conversion of the Fe³⁺/ferricyanide complex to Fe²⁺/ferrous and the concentration of Fe²⁺ can be established by measuring at 700 nm. A higher absorbance at 700 nm indicates a higher reducing power (Barros et al., 2007).

The reducing powers of all extracts were excellent and increased with increasing concentration, as shown in Fig 7.

From the figure, we note that at a concentration of 1 mg/mL, the three extracts have absorbances of 0.4, 1 and 1.145 for EM, EA and EE, respectively. When the concentration is increased, the absorbances increase. These extracts have a maximum optical density of 4.78, 3.65 and 3.742, respectively, at a final concentration of 7mg / mL. Whereas ascorbic acid has a DO of 5.12 at the same concentration. We may remember that the EE extract showed the most iron reduction activity compared to the other two extracts, but slightly lower than the ascorbic acid extract, represented by the high optical densities obtained at different concentrations.

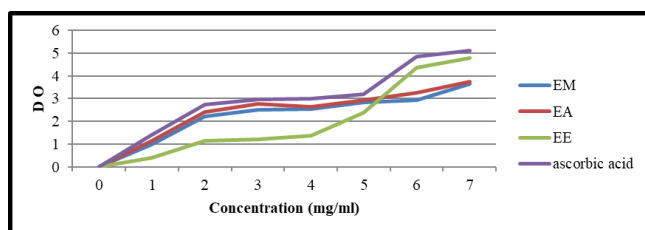


Figure 8: Reducing power of *E. alata* extracts and ascorbic acid.

4. Conclusion

The results of the present study provide enough evidences that medicinal plants still play an important role in the primary health care system of Bechar's people. During this survey, it was observed that people questioned use *E.alata* to treat many ailments, including cancer.

The phytochemical analysis showed that the *E. alata* plant extracts contain a mixture of phytochemicals as flavonoids, reducing sugars and alkaloids. On the other hand, the aqueous extract of *E. alata* has a promising antibacterial effect on different types of bacteria (gram positive and gram negative bacteria) as well as an antifungal effect.

The ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) assays indicated that the plant extracts have a potent antioxidant activity which can be an excellent option for biological and chemical analysis and can be further subjected to the isolation of the therapeutically active compounds

Further detailed investigations are required

1) To find the active compounds those are respon-

sible for these activities.

2) To know the exact mechanism of action.

3) To discover other activities that might be present in this plant.

References

Georgopapadakou N. H, Walsh T. J (1996) Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40:279–291.

Mohanasundari C, Natarajan D, Srinivasan K, Umamaheswari S. A, Ramachandran A (2007) Antibacterial properties of *Passiflora foetida* L. a common exotic medicinal plant. *African Journal of Biotechnology* 6(23) 2650-2653.

Farnsworth N (1990) The role of ethnopharmacology in drug development. *Bioactive compounds from plants. Ciba Foundation Symposium* 154 : 2-21.

Cowan M (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12(4):564–582.

Friedman W. E (1996) Introduction to biology and evolution of the Gnetales. *International journal of plant sciences* 157: S1–S2.

Rustaiyan A. K, Javidnia M. H, Farjam F, Ezzatzadeh E (2011) Antimicrobial and antioxidant activity of the *Ephedra sarcocarpa* growing in Iran. *Journal of Medicinal Plants Research* 5 (17): 4251–4255.

Abourashed E, El-Alfy A, Khan I, Walker L(2003) Ephedra in perspective-a current review. *Phytotherapy Research* 17 703-12.

Merzougui T, Kabour A, Bouanani A, Mekkaoui A, chebbah L (2008) Un modèle de gestion intégrée des ressources en eau dans une zone hyperaride : Cas de l'oasis de Béni Abbès (Vallée de la Saoura, sud ouest algérien). 13e Congrès Mondial de l'Eau, 1-4 septembre, Montpellier, France 1-12.

Shukla S, Mehta A (2015) Anticancer potential of medicinal plants and their phytochemicals: a review. *Brazilian Journal of Botany* 38 (2):199–210.

Hyuga S, Hyuga M, Oshima N, Maruyama T, Kamakura H, Yamashita T, Yoshimura M, Hakamatsuka Y, Odaguchi T. H (2016) Ephedrine alkaloids-free Ephedra Herb extract: a safer alternative to ephedra with comparable analgesic, anticancer, and anti-influenza activities. *Journal of Natural Medicines* 70: 571-583.

Lamine J.B , Boujbiha M.A, Dahane S, Cherifa A.B, . Khelifi A, Chahdoura H, Yakoubi M.T, Ferchichi S, El Ayeb N, Achour L (2019) A-amylase and α -glucosidase inhibitor effects and pancreatic response to diabetes mellitus on wistar rats of ephedra alata areal part decoction with immunohistochemical analyses. *Environmental Science and Pollution Research* 26: 9739-9754.

Ibragic S, Sofić E (2015) Chemical composition of various Ephedra species. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences* 15: 21.

Sioud F, Toumia I.B, Lahmer A, Khelifi R, Dhaouefi Z, Maatouk M , Ghedira K, Chekir-Ghedira L (2020) Methanolic extract of Ephedra alata ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity and hepatotoxicity through reducing oxidative stress and genotoxicity. *Environmental Science and Pollution Research* 27: 12792–12801.

Edeoga H. O, Own D. E, Mbaebie B. O (2005) Phytochemical consti-

- tments of some Nigerian medicinal plants. *Afri J Biotechn* 4 (7): 685-688.
- Jigna P, Sumitra V. C (2007) In vitro antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plants. *Turk J Biol* 31:53-58.
- Hussain I, Khan N, Ullah R, Shanzeb, Ahmed S, Khan FA (2011) Phytochemical, physiochemical and antifungal activity of *Eclipta alba*. *Afr J Pharm Pharmacol* 5(19): 2150–2155.
- Harbone J. B (1984) *Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis.* Chapman and Hall, London.
- Bauer A. W, Kirby W. M, Sherris J. S, Turck M (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Amer J Clin. Pathol* 45 : 493-496 .
- CLSI clinical and laboratory standards institute (2006) *Methods for dilution antimicrobial susceptibility testing for bacteria that grow aerobically.* Approved standard M7-A7. Wayne, PA; 26.
- Dixit S. N, Tripathi S.C, Upadhyey R.R (1976) the antifungal substance of rose flower (*Rosa indica*). *Economic botany* 30: 371-374.
- Burits M, Bucar F (2000) Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research* 14: 323-328 .
- Oyaizu M (1986) Studies on products of browning reaction- Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal Of Nutrition* 44: 307–315.
- Benkhniguel O, Zidane L, Fadli M, Elyacoubi H, Rochdi A, Douira A (2011) Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Mechraâ Bel Ksiri (Région du Gharb du Maroc). *Acta Bot Barc* 53: 191–216.
- Hammodi R, Ramdane F, Hadj Mahammed M, Didi Ould Hadj M, Chanai A, Hillali N, Mesrouk H, Bouafia I, Bahaz C (2015) Ethnobotanical study of some medicinal plants from Hoggar, Algeria. *Journal of Medicinal Plants Research* 9(30):820-827.
- Havsteen B (1983) Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol* 32:1141–1148.
- Süzgeç-Selçuka S, Birteksöz B. S (2011) Flavonoids of *Helichrysum chasmolycicum* and its antioxidant and antimicrobial activities. *South African Journal of Botany* 77:170–174.
- Liu H, Mou Y, Zhao J (2010) Flavonoids from *Halostachys caspica* and their antimicrobial and antioxidant activities. *Molecules* 15(11):7933–7945.
- Cushnie T. P. T, Lamb A. J (2005) Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26: 343–356.
- Iserin P (2001) *Larousse Encyclopédie des plantes médicinales.* Larousse, Paris.
- Barile E, Bonanomi G, Antignani V, Zolfaghari B, Ebrahim Sajjadi S, Scala F, Lanzotti V (2007) Saponin from *Allium minutiflorum* with antifungal activity. *Phytochem*.68: 596-603.
- Bruno D, Agnès M (2015) *Traité de neurologie : démences.* Doin, France.
- Lunn J, Theobald H (2006) The health effects of dietary unsaturated fatty acids. *Journal of Nutrition Bulletin* 31 :178-224.
- Celiktas O, Hames Kocabas E, Bedir E, Vardar Sukan F, Ozek T, Baser K H C (2007) Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry* 100: 553–559.
- Bruneton J (1999) *Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes médicinales – Techniques et documentations.* Lavoisier, Paris.
- Delattre C, Bernard D , Mehul B, Thomas-Collignon A , Donovan M (2005). Identification and characterization of a novel retroviral-like aspartic protease specifically expressed in human epidermis. *Journal Of Investigative Dermatology* 125: 278-287 .
- Banso A, Adeyemo S. O, Jeremiah P (1999) Antimicrobial properties of *Vernonia amygdalina* extract. *Journal of Applied Science and Management* 3 : 9-11
- Sikkema J, De Bont J A , Poolman B (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Mol Biol Rev* 59 : 201-222.
- Omidbeygi M, Barzegar M, Hamidi Z, Naghdibadi H (2007) Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control* 18: 1518–1523.
- Cristani M, D'arrigo M, Mandalari G, Castelli F, Sarpietro M.G, Micieli D (2007) Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with modal membranes: Implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 6300-6308.
- Parejo I, Viladomat F, Bastida J, Rosas-Romeo A, Flerlage N, Burillo J (2002) Comparison between the radical-scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and non-distilled mediterranean herbs and aromatic plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 6882–6890.
- Meyers K. J, Watkins C. B, Pritts M. P, Liu R. H (2003) Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:6887–6892.
- Barros L , Ferreira M, Queiro's. B, Ferreira I, Baptista P (2007) Total phenols, ascorbic acid, b-carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chemistry* 10: 413–419.

ABOUT THE JOURNAL: SAJEB (eISSN: 2230-9799) is a peer-reviewed, open-access and online journal aimed at advancement and rapid dissemination of scientific knowledge generated by the highly motivated researchers in the field of biological sciences through publication of high-quality original research and critical up-to-date review articles covering all the aspects of biological sciences. Every year, it publishes six issues. SAJEB has received Global Impact Factor (GIF)-2015, 0.765; Index Copernicus Value-2015, 93.0 and NAAS (ICAR)-India 2017 rating, 4.79. SAJEB has been included in the ISI master list of journals of Thomson Reuters under Zoological Record. The SAJEB is also covered by CABI (UK), AGRICOLA, NLM catalogue, CAS (ACS, USA), DOAJ, Journal TOCs (ICBL, Edinburgh), Directory of research Journals Indexing (DRJI) and Indian Science Abstracts (ISA, NISCAIR). SAJEB is a member of CrossRef.