

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة 8 ماي 1945 قالمة
Université 8 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la terre et de l'Univers



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine: Science de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité/Option: Immunologie appliquée
Département: Biologie

Thème

Étude de l'activité anti-inflammatoire, anti-oxydante et anti-microbienne d'une plante médicinale : Ephedra alata alenda

Présenté par :

Melle BOUGUETTAYA Selma

Mme DEHAMNIA Radja

Devant le jury composée de :

Mme BENDJEDDOU. D

Mr OUMEDDOUR.A/K

Mr BOUDEN.I

Président (Pr)

Examineur (MCB)

Encadreur (MCB)

Université de Guelma

Université de Guelma

Université de Guelma

Juillet 2019



Remerciements

Louange à Allah, seigneur de l'Univers, le tout puissant et miséricordieux, qui m'a inspirée et comblée de ses bienfaits. Je lui en rends grâce.

Que mes remerciements et ma profonde gratitude aillent à :

- *Madame BENDJEDOU D, Professeur à l'université de Guelma, pour avoir bien voulu accepter la présidence de mon jury. Qu'elle trouve ici l'expression de mon profond respect.*
- *Monsieur BOUDEN Ismaïl, mon promoteur, pour l'intérêt scientifique qu'il a porté à ce travail. Il m'a guidée et fait bénéficier de ses précieux conseils tout au long de l'élaboration de ce mémoire. Qu'il soit assuré de ma reconnaissance et mon respect indéfectibles.*
- *Monsieur OUMEDDOUR A/K, enseignant au département de biologie, université de Guelma, pour avoir accepté de participer à mon jury.*
- *J'adresse mes vifs et sincères remerciements à Madame HIMER Ratiba, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour son aide précieuse, ainsi qu'à tous les ingénieurs des laboratoires du département de biologie.*
- *Je voudrais également exprimer ma reconnaissance et ma gratitude à mon oncle BOUGUETTAYA Med Tahar pour l'aide qu'il m'a apportée dans la préparation du présent mémoire.*

Je tiens à remercier tout particulièrement ma famille qui m'a accordé la liberté d'action et la patience nécessaire pour réaliser ce travail, de m'avoir encouragée et soutenue. Sans eux, je n'en serais pas là.

Je n'oublie bien évidemment pas mes camarades de promotion; je les remercie chaleureusement pour tous ces moments agréables passés ensemble.

À tous ceux qui m'ont aidée de près ou de loin dans la réalisation de ce mémoire.

Enfin, je voudrais finir par une citation de Marcel PROUST:

"soyez reconnaissants aux personnes qui vous donnent du bonheur; elles sont les charmants jardiniers par qui nos âmes sont fleuries".

BOUGUETTAYA Selma.

DEHAMNIA Radja.



Dédicace

Je dédie ce modeste travail

Aux êtres qui me sont le plus chers dans ma vie.

À la bougie, source de la lumière de ma vie, qui se fond toujours pour éclairer ma route, mon très cher père, je dédie ce modeste travail. Je te souhaite, PAPA, une longue et belle vie.

À la fleur qui réhausse, aromatise et égaie mes jours, et qui veillait des nuits durant, pendant toute mon enfance jusqu'à m'endormir, je dédie ce modeste travail. MAMAN, je te souhaite une vie longue et pleine de bonheur.

*À mon frère: **OUSSAMA**.*

*À mes sœurs: **RANDA** et **MENNA**.*

*À ma belle sœur : **ADALA**.*

*À mon petit cœur: mon neveu, le petit ange **YAAKOUB**.*

À toute ma famille.

*À mon promoteur: **Mr BOUDEN Ismaïl**,*

pour l'encadrement judicieux dont il m'a honorée pour la préparation du présent mémoire .

À tous mes enseignants. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

*À toi, ma très chère sœur, mon complément dans le binôme , **Mme DEHAMNIA Radja** (ma très chère **Romaïssa**), à toute ta famille et ton cher père qui me fut enseignant au lycée. Ensemble nous avons pu réaliser et achever ce travail; ta présence m'a été un grand support. Puisse Allah le Tout Puissant préserver notre amitié.*

À la promotion d'immunologie appliquée 2019 sans exception.

À tous ceux qui me sont chers

✦ Selma



Dédicace

Je m'incline devant Dieu tout puissant qui M'a ouvert la porte du savoir et M'a aidé la franchir

Avec un cœur plein d'amour et de fierté je dédie ce travail :

*À l'étoile de mon ciel qui a su mettre la lumière dans mon univers, qui m'a toujours entourée d'amour, pour me soutenir et m'encouragée durant toute ma vie et donné l'espoir de poursuivre ce chemin jusqu'au bout «**ma chère mère**». Que dieu la protège.*

*À l'homme le plus généreux du monde, à celui qui a été toujours présent, qui m'a appris les valeurs de la vie, qui m'a soutenu en toutes circonstances et à celui qui m'a tout donné sans cesse, «**mon cher père**». Que dieu le garde.*

*À mon époux **Nacer-eddine** qui m'a soutenu et m'a encouragé et, m'a donné les efforts je dédie ce travail et je lui souhaite une longue belle vie.*

*À mon frère adorable **Saad** et sa femme **Hana** et leur petite jolie **Manissa**. Que dieu les protèges.*

*À mon petit frère adorable **Taki-eddine**.*

*À ma chère petite sœur **Djihane**.*

*À **ma belle-mère** et mon beau-frère **Hamdi**. Que Dieu les protèges.*

*À la mémoire de **mon beau père**.*

*À ma chère copine et binôme **Selma** avec elle on a peut surmonter tous les obstacles.*

À tous ceux qui ont participé à la réalisation de ce travail de près ou de loin.

À toute ma famille de près ou de loin.

À toutes mes amies.

À tous ceux qui me connaissent.

Et à toute la promotion Immunologie appliquée 2018/2019.

Radja

Table des matières

Remerciements

الملخص

Résumé

Abstract

Abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 01

Première partie : Etude bibliographique

chapitre 1 : Généralités 03

chapitre 2 : *Ephedra alata alenda*

1. Généralités sur la plante 18

1.1. Genre *Ephedra* 18

2. Sous espèce *Ephedra alata alenda* 19

2.1. Classification systématique d'*Ephedra alata* 19

2.2. Description botanique 19

2.3. Répartition géographique 20

2.4. Utilisation 20

2.5. Pharmacologie 21

2.6. Toxicologie 22

3. Travaux antérieurs 22

3.1. Activités biologiques de la plante 22

3.1.1. Activité antimicrobienne.....	22
3.1.2. Effet sur la masse corporelle	23
3.1.3. Effet hypoglycémiant	23
3.1.4. Effet anti-inflammatoire	23
3.1.5. Action sur la pression artérielle	24
3.2. Chimie de la plante	24
A. Flavonoïdes	25
B. Tanins	25
C. Huiles essentielles	25

Deuxième partie : Etude expérimentale

1. Matériel biologique.....	26
1. 1. Matériel végétal	26
1.2. Matériel animal.....	26
2. Méthodes	27
2.1. Préparation de l'extrait brut aqueux par Extraction Solide - Liquide (ESL)	27
2.2. Pouvoir antioxydant de l'extrait brut.....	27
2.2.1. Piégeage du DPPH	27
2.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne	28
2.3.1. Activité antibactérienne	28
2.3.1.1. Les souches ciblées	28
A. Escherichia coli	28
B. Pseudomonas aeruginosa	29
C. Staphylococcus aureus	29

2.3.1.2. Méthode de détermination de l'activité antibactérienne	29
2.3.2. Activité antifongique	30
A. <i>Aspergillus niger</i>	30
B. <i>Candida albicans</i>	30
2.4. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire (inflammation aigue) <i>in vivo</i>	31
2.4.1. Taux des cellules immunitaires (leucocytes, lymphocytes, granulocytes)	32
2.4.1. Analyses statistiques	32
I. Résultats	33
1. Activité anti-oxydante	33
1.1. Pouvoir de piégeage du radical libre DPPH	33
2. Evaluation de l'activité antibactérienne	35
2.1. Activité antibactérienne	35
2.2. Evaluation de l'activité antifongique	37
3. Activité Anti-inflammatoire <i>in vivo</i>	38
3. 1. Pourcentage d'augmentation du volume de la patte	38
3.1.1. Groupe contrôle	38
3.1.2. Groupe traités	39
3.2. Pourcentage d'inhibition de l'œdème de la patte (%INH)	39
3.2.1. Groupe traité EAEAA (200 mg /kg)	39
3.2.2. Groupe traité EAEAA (400 mg/kg)	40
3.3. Effet de l'extrait aqueux d' <i>Ephedra alata alenda</i> sur le taux de cellules immunitaire.....	40
Conclusion et perspectives.....	45

Références bibliographique

ملخص

أظهر تقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلص المائي لنبتة *العنودة* بواسطة اختبار DPPH نشاطا مضادا جد مهم للجذور الحرة بالمقارنة مع الفيتامين C، حيث سجل أكبر معدل لتثبيط جذر الـ DPPH بتركيز 1 ملغ/مل، بقيمة قدرت بـ 78.30٪، بينما الفيتامين C بلغ 87.20٪ بنفس التركيز. دراسة النشاط المضاد للالتهابات داخل الجسم أظهر أن حقن الفورمول أدى إلى زيادة جد نوعية في حجم كف قدم الفئران المعالجة (تحت الصفاق)، عن طريق المستخلص المائي لنبتة *العنودة* (الجرعة 400 ملغ/كلغ وزن الجسم) أدت إلى انخفاض في حجم وذمة كف الفئران خلال ساعات التجربة. لوحظ انخفاض معنوي في معدل الخلايا المناعية المتدخلة في العمليات الالتهابية. أظهرت طريقة الانتشار على الأقراص في الوسط الجيلوزي نشاطا قويا للمستخلص الخام للنبتة المدروسة ضد نمو البكتيريا *Staphylococcus aureus* و نشاطا ضعيفا مثبطا لنمو البكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli*، و كذلك نشاطا مثبطا لنمو الفطريات *Aspergillus niger* و *Candida albicans*. و في الختام تبين من خلال هذه الدراسة أن الاستعمال الواسع لنبتة *العنودة* في الطب التقليدي أنها تمتلك فعالية مضادة للميكروبات، مضادة للأكسدة و مضادة للالتهابات.

الكلمات المفتاحية: *العنودة* ، مضاد الأكسدة ، مضاد الالتهابات ، مضاد الميكروبات

Résumé

L'évaluation du potentiel antioxydant extrait aqueux de *Ephedra alata alenda* par le test de DPPH a révélé une activité anti-radicalaire plus importante de cette plante par rapport à la vitamine C, un maximal taux d'inhibition du radical DPPH est enregistré à la concentration 1mg/ml avec une valeur de 78.30%, alors que la vitamine C atteint une valeur de 87.2% à la même concentration. L'étude de l'activité anti-inflammatoire *in vivo* montre que l'injection du formol entraîne une augmentation très significative du volume de la patte des souris. L'administration (i.p) de l'extrait aqueux de *Ephedra alata alenda* (400 mg/Kg de p.c) provoque une diminution du volume de l'œdème de la patte des souris pendant les heures de l'expérimentation. Une diminution significative dans le taux des cellules immunitaires intervenant dans les processus inflammatoire est observée. La méthode de diffusion sur disques en milieu gélosé, a montré une forte activité de l'extrait brut de la plante contre la croissance de *Staphylococcus aureus*, et une faible activité inhibitrice de la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* et une activité inhibitrice de la croissance des champignons. En conclusion, l'étude a révélé que *Ephedra alata alenda* plante largement utilisée en médecine traditionnelle, possède effectivement un pouvoir antimicrobien, antioxydant et anti-inflammatoire.

Mots clés : *Ephedra alata alenda*, antioxydant, antimicrobienne, anti-inflammatoire.

Abstract

The evaluation of the aqueous extract antioxidant potential of *Ephedra alata alenda* by DPPH test revealed a higher anti-radicalar activity of this plant compared to vitamin C, a maximum inhibition rate of DPPH radical was recorded at the concentration 1mg/ml with a value of 78.30%, whereas vitamin C reached a value of 87 2% at the same concentration. The study of anti-inflammatory activity in vivomus shows that the injection of formol causes a very significant increase in the volume of the mouse paw. The administration (i.p) of the aqueous extract of *Ephedra alata alenda* (400 mg/kg of b.w) causes a decrease in the volume of the edema of the mouse paw during the hours of the experiment. A significant decrease in the rate of immune cells involved in inflammatory processes was observed. The diffusion method on disks in agar medium showed strong raw extract activity against growth of *Staphylococcus aureus* and low inhibitory activity of growth of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* and an inhibitory activity of the fungi increase. In conclusion, the study revealed that *Ephedra alata alenda* plant widely used in traditional medicine, and indeed possesses antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory power.

Key words: *Ephedra alata alenda*, antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory.

Liste des abréviations

- **% AUG** : Pourcentage d'augmentation
- **%INH** : Le pourcentage d'inhibition
- **5'-MHC** : 5'-Méthoxyhydnocarpine
- **AC** : Absorbance du contrôle négatif
- **AcOET** : Acétate d'éthyle
- **AE** : Absorbance de l'échantillon testé
- **AINS** : Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens
- **AIS** : Anti-Inflammatoires Stéroïdiens
- **AMP** : Adénosine monophosphate
- **ATCC** : American Type Culture Collection
- **ATP** : Adénosine triphosphate
- **AUG** : Augmentation
- **BHA** : Adénosine triphosphate
- **BHT** : Butylated hydroxytoluene
- **Ca** : Calcium
- **CAT** : Catalase
- **CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice
- **COX** : Cyclooxygénase
- **Cu-SOD** : SOD à Cuivre
- **DCM** : Dichlorométhane
- **DMSO** : Diméthyle sulfoxyde
- **DO** : Densité Optique
- **DPPH•** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
- **E**: Ephedra
- **EAA** : *Ephedra Alata Alenda*

- **EAEAA** : Extrait Aqueux *d'Ephedra Alata Alenda*
- **ERO** : Espèces Réactives de l'Oxygène
- **Fc** : Fragment Constant
- **Fe-SOD** : SOD Ferreux
- **FNS** : Formule Numération Sanguine
- **g** : Gramme
- **GMH** : Gélose Muller Hinton
- **GPx** : Glutathion Peroxydase
- **GR** : Glutathion Réductase
- **GSH** : Glutathion
- **H2O2** : Peroxyde d'hydrogène
- **HOCl** : Acide Hypochloreux
- **HSV** : Herpès Simplex Virus
- **I %** : Pourcentage d'inhibition
- **I.P** : Intra-Péritonéale
- **IC50** : Concentration d'Inhibition 50%
- **ICAM-1** : intercellulaire adhérence molécule-1
- **IL** : Interleukine
- **INH** : Inhibition
- **Lps** : Lipopolysaccharide
- **LT** : Leucotriène.
- **M.T.A** : Médicaments Traditionnels Améliorés
- **MCV** : maladie cardio vasculaire
- **mg** : Milligramme
- **MIC** : concentration minimale inhibitrice
- **ml** : Millilitre

- **mm** : millimètre
- **Mn-SOD** : SOD à Manganèse
- **NaCl** : Chlorure De Sodium
- **NADH** : Nicotinamide adénine dinucléotide
- **NADPH** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
- **nm** : nanomètre
- **NO•** : Monoxyde d'Azote
- **NOS** : Nitrique Oxyde Synthase
- **O₂⁻** : Anion Superoxyde
- **O₂** : Oxygène
- **OH•** : Radical Hydroxyde
- **OMS** : Organisation Mondiale de la Santé
- **ONOO•** : Peroxynitrite
- **p.c** : poids corporelle
- **PAF** : Facteur Activateur de Plaquettes
- **PNN** : Polynucléaires Neutrophiles
- **Rodox** : oxydo-reduction
- **ROS**: Reactive Oxygène Specis,
- **Se-GPx** : Sélénoenzyme
- **SEM** : Standard erreur moyenne
- **SNC**: système nerveux central
- **SOD** : Superoxyde Dismutase
- **TNF α** : facteur de nécrose tumorale.
- **Vit C** : Vitamine C
- **μ l** : Microlitre

listes des figures

<u>Figure</u>	<u>titre</u>	<u>page</u>
Figure : 1	Déséquilibre de la balance entre pro-oxydant et antioxydant	4
Figure : 2	Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie	5
Figure : 3	Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants	6
Figure : 4	Les grandes étapes de la réaction inflammatoire aiguë	9
Figure : 5	Squelette de base des composées phénoliques.	15
Figure : 6	Répartition géographique de l' <i>Ephedra</i> dans le monde	18
Figure :7	Photo de la plante <i>Ephedra alata alend</i>	20
Figure : 8	Aspect morphologique de l'espèce <i>Ephedra alata alenda</i>	26
Figure : 9	Profil de l'activité anti-radicalaire (test DPPH•) de l'extrait aqueux d' <i>ephedra alata alenda</i> ,	33
Figure : 10	Résultats des IC ₅₀ (exprimées en mg/ml) d'inhibition du DPPH de l'extrait brut.	34
Figure : 11	Les zones d'inhibition exercées par extrait aqueux <i>Ephedra alata alenda</i> sur les souches bactériennes testées.	35
Figure : 12	Les zones d'inhibition exercées par extrait aqueux <i>Ephedra alata alenda</i> sur les souches fongiques testées.	37

Figure : 13	Pourcentage de l'augmentation du volume de la patte des groupes testés.	39
Figure : 14	Pourcentage moyen d'inhibition de l'œdème des pattes droites des souris	40
Figure : 15	Taux des leucocytes chez les différents groupes traités.	41
Figure : 16	Taux des lymphocytes chez les différents groupes traités.	42
Figure : 17	Taux des granulocytes chez les différents groupes traités.	42

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
Tableau. 1	Origines cellulaires et effets des principaux médiateurs inflammatoires.	12
Tableau. 2	Effet des différentes concentrations de l'extrait de <i>Ephedra alata alenda</i> sur les trois souches bactériennes	35
Tableau.3	Effet des différentes concentrations de l'extrait de <i>Ephedra alata alenda</i> sur les deux champignons testé (zone d'inhibition en mm)	38

Introduction

Durant des siècles voire des millénaires, l'Homme a utilisé les plantes pour soulager ses douleurs, guérir ses maux et panser ses blessures. Actuellement, et malgré le progrès de la pharmacologie, l'usage thérapeutique des plantes médicinales est très présent même dans les pays développés.

Plusieurs pays d'Afrique, y compris l'Algérie, mènent des investigations visant à développer des médicaments issus de plantes à usage médical traditionnelle, en menant des études phytochimiques, pharmaco-toxicologiques et cliniques pour la mise au point de médicaments traditionnels améliorés (M.T.A.).

Les plantes médicinales ont toujours eu un rôle de grande importance sur la santé (Carillon, 2000). À l'heure actuelle, les substances naturelles dans les plantes sont encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles représentent près de 60% des médicaments, dont nous disposons (O.M.S, 2000). Les 40% restants, ou médicaments de synthèse, sont souvent nés de la synthèse chimique de molécules ou parties de molécules naturelles prises comme tête de séries (Fouché *et al.*,2000).

Les effets biologiques des polyphénols ont été évalués dans de nombreuses études et souvent associés à leurs propriétés antioxydantes intrinsèques. Il a été montré *in vitro* que les polyphénols ont des effets protecteurs sur des modèles de stress oxydatif. Des données récentes suggèrent que les polyphénols ont la capacité d'agir sur l'expression des gènes ainsi que sur de nombreuses voies de signalisation impliquées dans des processus pathologiques comme l'inflammation.

C'est dans ce contexte que s'inscrit le présent travail de recherche dont l'objectif essentiel consiste à vérifier l'activité anti-inflammatoire, antioxydante et antimicrobienne d'un extrait brut de la partie aérienne d'une plante médicinale algérienne appartenant à la famille des Ephedraceae, du genre *Ephedra*: *Ephedra alata alenda*, connue pour son utilisation médicinale traditionnelle.

Les objectifs de ce travail peuvent être résumés comme suit :

- Évaluation des propriétés anti-inflammatoires *in vivo* ;

- évaluation des propriétés anti-oxydantes ;
- examen des effets antimicrobiens ;
- recherche de corrélation, entre les différentes activités et le contenu phytochimique, essentiellement les teneurs en polyphénols et flavonoïdes.

I. Généralités

La découverte d'espèces chimiques radicalaires présentes normalement dans l'organisme a bouleversé notre compréhension des mécanismes biologiques. Ces radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques ; ils sont utiles pour l'organisme à doses raisonnables et étudiées. Leur production peut toutefois devenir excessive et l'organisme va devoir se protéger de ces excès par différents systèmes antioxydants. Dans les circonstances quotidiennes normales, des radicaux libres sont produits en permanence en faible quantité comme les médiateurs tissulaires ou les résidus des réactions énergétiques ou de défense, et cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense, d'ailleurs adaptatifs par rapport au niveau de radicaux présents. Dans ces circonstances, la balance antioxydants/prooxydants est en équilibre, mais dans certaines situations, en raison d'une surproduction radicalaire (tabac, alcool, pollution et certaines pathologies comme le diabète, le cancer, le SIDA, l'inflammation, les pathologies cardiovasculaires) ou d'une diminution des capacités antioxydants (insuffisance d'apports des micronutriments antioxydants, inactivations enzymatiques), un déséquilibre entre production de radicaux libres et le système de défense est à l'origine d'un état redox altéré de la cellule appelé stress oxydatif (**Figure 1**) (**Pincemail et al., 2000**).

Pour définir le stress oxydant, il faut d'abord définir ce que sont les radicaux libres. Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire qui lui confère une réactivité vis-à-vis d'autres molécules. Celle-ci est variable selon la nature du radical. En biologie, les radicaux libres sont formés le plus souvent par gain d'électrons à partir de l' O_2 .

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) regroupent l'ensemble des dérivés radicalaires de l'oxygène (O_2^- , OH^\bullet , NO^\bullet , ROO^\bullet), mais également les composés non radicalaires ($ROOH$, H_2O_2 , $1O_2$) (**Milane, 2004**).

Il est important d'évoquer alors le paradoxe de l' O_2 : il est indispensable au fonctionnement cellulaire mais il est aussi la source des ERO qui peuvent provoquer des dommages aux macromolécules biologiques (ADN, protéines, phospholipides membranaire) (**Droge, 2002**). Les ERO sont impliqués dans la prolifération cellulaire, la mort cellulaire programmée en agissant comme second messager (**Thannickal et Fanburg, 2000 ; Droge, 2002**).



Figure1: Déséquilibre de la balance entre pro-oxydants et antioxydants
(Pincemail *et al.*,2000).

Dans les cellules de mammifères, les radicaux libres proviennent essentiellement de réactions enzymatiques et découlent principalement de la NADPH oxydase membranaire ou du complexe enzymatique mitochondrial de la chaîne respiratoire.

En effet, la production de radicaux libres est une conséquence inévitable de la respiration aérobie qui consomme de l'oxygène moléculaire (O_2). Le métabolisme énergétique des organismes aérobies dépend de la phosphorylation oxydative, processus par lequel l'énergie du transfert d'électrons formés lors du cycle de Krebs à partir du NADH, est transformée en une liaison phosphate dans la molécule d'ATP. C'est l'oxygène moléculaire qui sert d'accepteur final des électrons lors de ce transfert (d'où le nom de chaîne respiratoire) : une molécule d' O_2 est réduite par 4 électrons en 2 molécules d' H_2O par cytochrome c oxydase.

L' O_2 est un bi-radical avec deux électrons célibataires mais il ne peut pas accepter simultanément les électrons nécessaires à sa réduction en H_2O . Ainsi, la réduction incomplète de l' O_2 en H_2O peut conduire à la formation d'intermédiaires réduits, hautement réactifs. La production des radicaux libres n'est pas négligeable puisque 2% des électrons de la chaîne de transfert conduisent à leur formation en conditions physiologiques normales (**Figure 2**)(Favier, 2003).

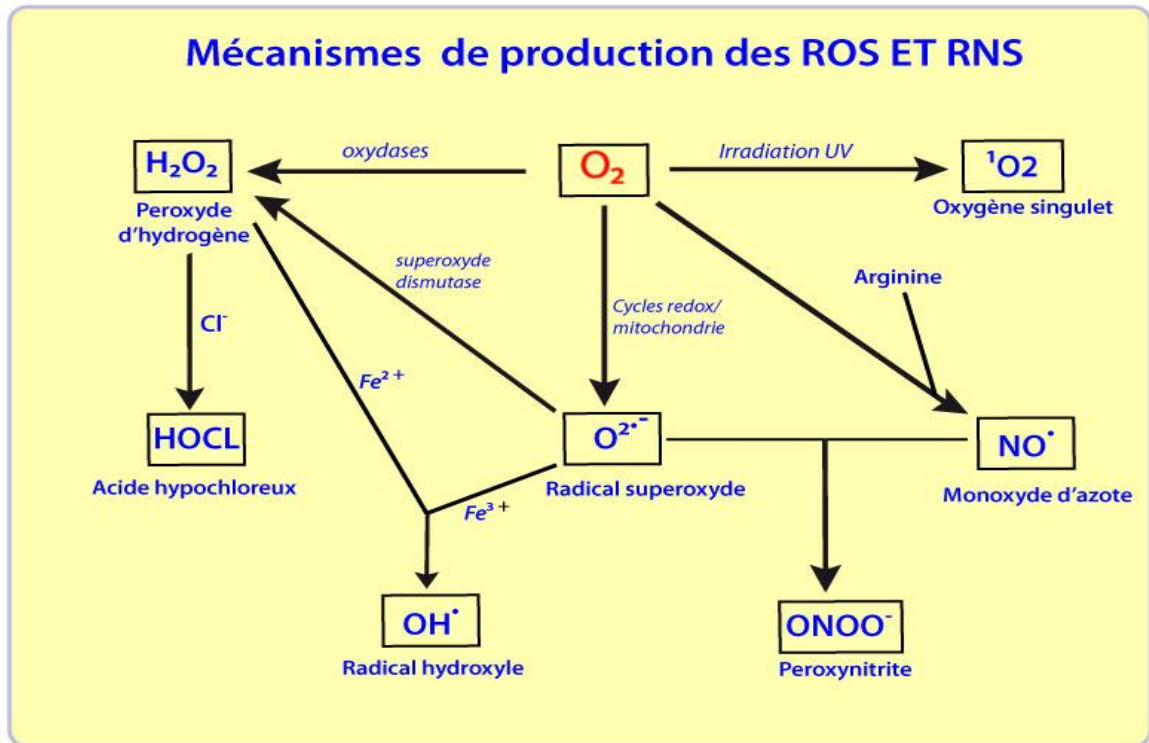


Figure 2: Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie (Favier, 2003).

La production et l'intervention dans de nombreuses fonctions cellulaires des ERO sont réalisées dans trois compartiments :

L' O_2 est incapable de traverser les structures membranaires, c'est pourquoi son action est essentiellement localisée en deux pools non communicants, l'un mitochondrial, l'autre cytosolique.

Un autre type d'espèce réactive, le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}), est produit chez les organismes supérieurs par l'oxydation de l'un des atomes N terminaux de la L-arginine, cette réaction est catalysée par la nitrique oxyde synthase (NOS) (Sorg, 2004). Cette production est physiologique et joue un rôle majeur dans la neurotransmission, régulation de la pression sanguine, mécanisme de défense, relaxation des muscles lisses, régulation immune (Valko *et al.*, 2007). Mais à forte concentration, le NO^{\bullet} devient délétère pour les cellules, notamment en réagissant avec le $O_2^{\bullet-}$ pour former un puissant oxydant le peroxynitrite ($ONOO^-$) qui peut secondairement se décomposer en d'autres oxydants comme le NO_2 et le OH^{\bullet} (Densiov et Afanas'ev, 2005).

Le maintien d'un niveau non cytotoxique des EOR est assuré par des systèmes d'antioxydants. Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats (Berger, 2006). Les cellules utilisent de nombreuses stratégies anti-oxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leurs niveaux d'espèces réactives de l'oxygène (Figure3). La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus, les types cellulaires et le milieu intracellulaire ou extracellulaire. Les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent se diviser en systèmes enzymatiques et en systèmes non enzymatiques (Goudable et Favier, 1997).

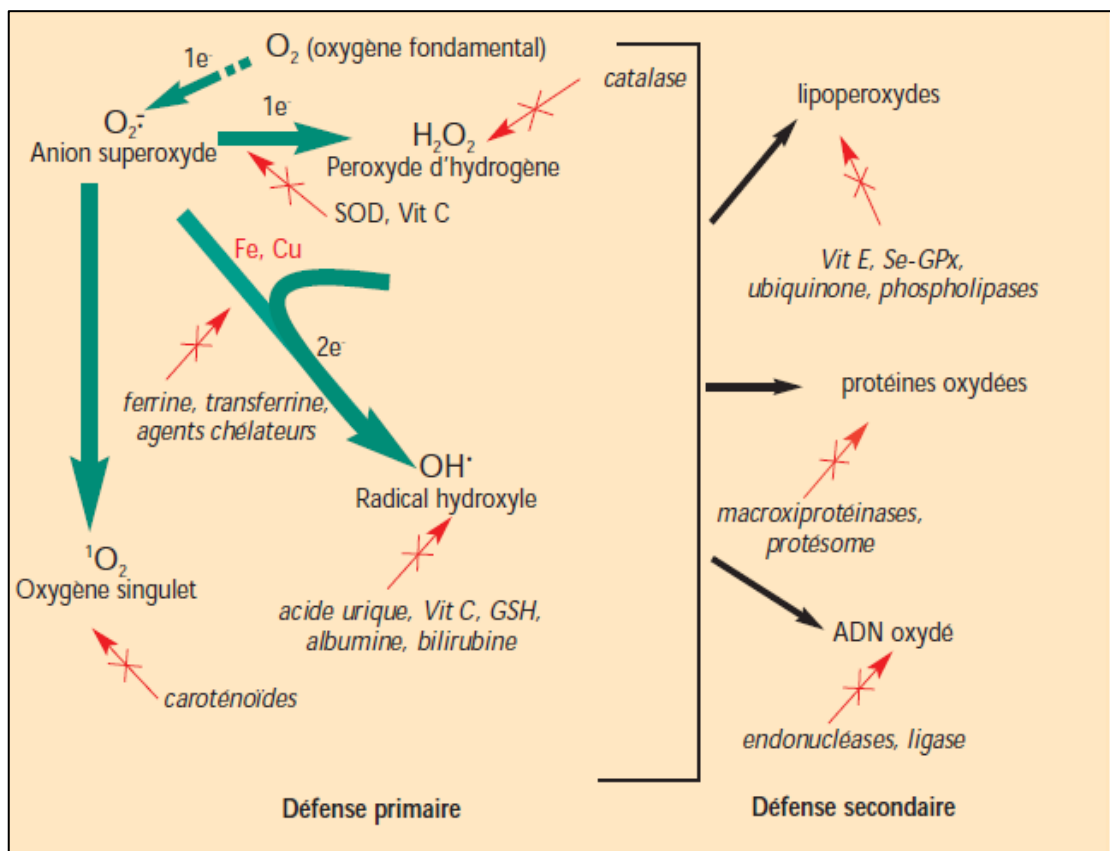


Figure3: Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants (Pincemail *et al.*, 2002).

Le système enzymatique comporte la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du $O_2^{\cdot-}$ et du H_2O_2 , conduisant finalement à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire (Lehucher-Michel *et al.*, 2001).

La superoxyde dismutase (SOD) : Elle accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, Il existe plusieurs isoenzymes de SOD ; SOD ferreux (Fe-SOD), SOD à cuivre (Cu-SOD) et SOD à manganèse (Mn-SOD) qui diffèrent selon la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire (**Zelko et al., 2002**).

La catalase présente en particulier dans les hématies et les peroxysomes hépatiques : Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (**Sorg, 2004**).

Les glutathions peroxydases et réductases : Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries. La glutathion peroxydase est une sélénoenzyme (Se-GPx) qui joue un rôle très important dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'autres hydroperoxy des résultants de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de ces dérivés réactifs avec l'oxydation de substrats réducteurs comme le glutathion (GSH). La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG tout en utilisant le NADPH comme un cofacteur (**Martínez-Cayuela, 1995 ; Sorg, 2004**).

Au total, le mécanisme réactionnel invoqué dans cette détoxification enzymatique peut être résumé selon le schéma suivant (**Martínez-Cayuela, 1995 ; Sorg, 2004**):

Le système non enzymatique renferme de nombreuses substances endogènes, notamment le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, la mélanine, la mélatonine, l'acide lipoïque. De tous ces composés endogènes synthétisés par les cellules, le plus important est sans doute le glutathion réduit (thiol majeur au niveau intracellulaire) (**Favier, 2003**). La bilirubine est, quant à elle, capable de piéger les radicaux peroxydes et l'oxygène singulier, protégeant ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (**Neuzil et Stocker, 1993**).

Les protéines chélatrices de métaux de transitions comme l'haptoglobine, la ferritine, l'albumine et la céruloplasmine agissent en diminuant la disponibilité d'agents pro-oxydants comme les ions Fe^{2+}/Fe^{3+} ou Cu^{2+}/Cu^{+} permettant par ce biais de prévenir la production des radicaux libres par la réaction de Fenton (**Martínez-Cayuela, 1995**).

Les ERO peuvent aussi agir comme messagers secondaires et activer différents facteurs ou gènes impliqués dans le développement de diverses pathologies (**Parke et Parke, 1995**).

Parmi ces pathologies, les maladies chroniques comme les maladies cardiovasculaires, les cancers, les maladies respiratoires, les diabètes, les maladies

digestives et les affections cutanées constituent de plus en plus un problème mondial de santé publique. Ces pathologies chroniques peuvent s'accompagner de processus inflammatoires, ce qui est souvent un des signes d'alerte vers les complications.

L'inflammation est par ailleurs une source importante de radicaux oxygénés produits directement par les cellules phagocytaires activées qui sont le siège d'un phénomène appelé explosion oxydative consistant en l'activation du complexe de la NADPH oxydase, enzyme capable d'utiliser l'oxygène moléculaire pour produire de grandes quantités d'anions superoxydes au niveau de la membrane cellulaire.

Ce mécanisme est capital dans la lutte anti-infectieuse car il permet la phagocytose des bactéries et des corps étrangers. Une autre espèce radicalaire, le monoxyde d'azote, est elle aussi produite par les systèmes enzymatiques que sont les différentes NO synthases (ou NOS), à des fins de médiation par les neurones, les cellules endothéliales ou les macrophages (**Sahnoun et al, 1998**).

L'inflammation est un processus de défense de l'organisme dont le but est de neutraliser, de combattre ou d'éliminer l'agent pathogène (endogène ou exogène) et de préparer la réparation des tissus. Les signes de ce processus sont : chaleur, rougeur, douleur, gonflement (**Majno, 2004 ; Kumar et al., 2003**).

L'inflammation se déroule dans le tissu conjonctif vascularisé. Les tissus dépourvus de vaisseaux (cartilage, cornée) sont incapables de développer une réaction inflammatoire complète. Les tissus épithéliaux n'ont pas de rôle actif dans le déroulement de la réaction inflammatoire mais ils peuvent être altérés par l'agression qui déclenche l'inflammation puis être réparés au cours de la phase terminale de l'inflammation (**Ruslan, 2008**).

Elle est un processus habituellement bénéfique : son but est d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires. Parfois elle peut être néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, du siège de l'inflammation, par anomalie de régulation du processus inflammatoire, ou par anomalie quantitative ou qualitative des cellules intervenant dans l'inflammation (**Ruslan, 2008**).

Les causes de la réaction inflammatoire sont multiples et représentent les agents exogènes. Ces causes déterminent des lésions cellulaires et tissulaires qui vont déclencher l'inflammation :

- Infection : contamination par des micro-organismes (bactéries, virus, parasites, champignons).
- Agents physiques : traumatisme, chaleur, froid, radiations.

- Agents chimiques : caustiques, toxines, venins.
- Corps étrangers : exogènes ou endogènes.

Il existe deux types d'inflammations : aiguë et chronique.

L'inflammation aiguë est caractérisée par quatre phénomènes typiques qui sont l'œdème, la douleur, la chaleur et la rougeur. Elle peut également s'accompagner d'atteintes fonctionnelles régionales selon la gravité de l'agression (**Botting et Botting, 2000**). Elle dure de quelques jours à quelques semaines. L'inflammation aiguë peut être divisée en trois grandes phases ; une phase vasculaire immédiate (de l'ordre de minutes) caractérisée par des modifications de la microcirculation locale, une phase cellulaire consécutive caractérisée par la mobilisation de nombreuses cellules immunitaires qui permettra l'élimination des microorganismes pathogènes et des tissus lésés, et une phase de résolution et de cicatrisation qui en quelques jours conduira à la restauration des tissus (**Weill et al., 2003**)(Figure 4).

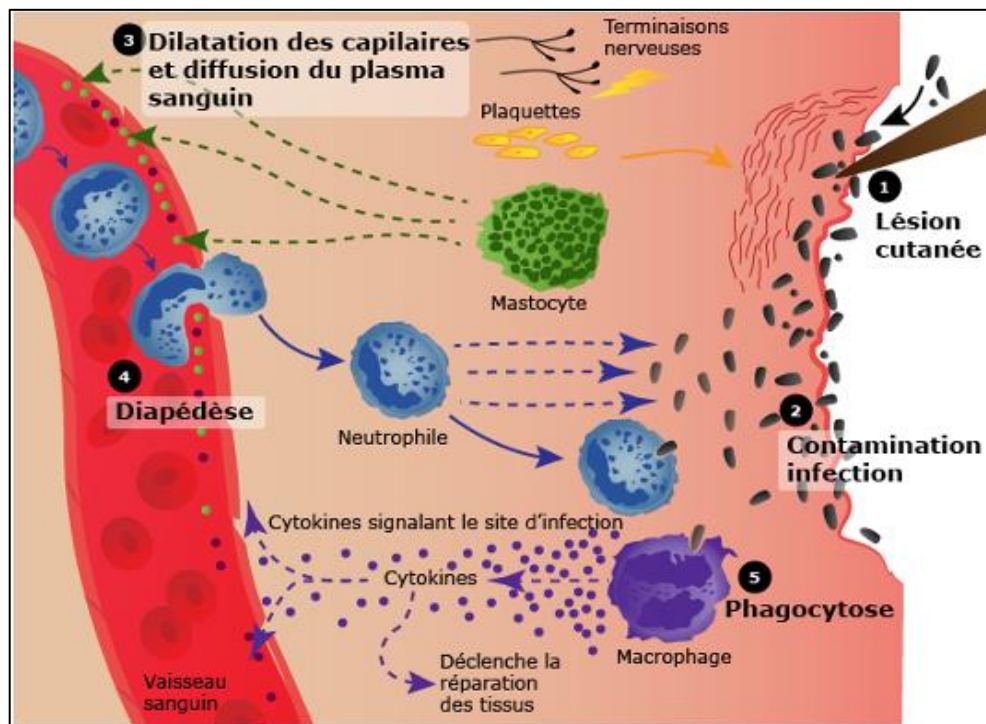


Figure 4: Les grandes étapes de la réaction inflammatoire aiguë (**Patrice, 2014**).

L'inflammation chronique se développe dans les conditions où persiste une agression ou dans les tissus soumis à des réactions auto-immunes, où l'antigène ne peut être éliminé (**Rankin, 2004**). Elle est caractérisée par une durée étalée sur des mois ou des années. Elle peut même se prolonger tout au long de la vie de l'individu (**Fauve et Hevin, 1998**). À la différence de ce qui se passe dans l'inflammation aiguë,

les phases vasculaires et cellulaires ne se succèdent pas mais coexistent tout au long de l'évolution de l'inflammation. Des phénomènes de destruction tissulaire et de tentatives de réparation sont également présents (**Weill et al.,2003**). Les cellules mononuclées et particulièrement les macrophages constituent l'essentiel de l'infiltrat cellulaire vers le site inflammatoire (**Fauve et Hevin, 1998 ; Weill et al.,2003**). La présence de lymphocytes dans l'infiltrat est habituelle. Tandis que la présence des polynucléaires éosinophiles est caractéristique des inflammations chroniques allergiques et parasitaires (**Dombrowicz et Capron, 2001**).

L'inflammation fait intervenir des cellules, des vaisseaux, des modifications de la matrice extracellulaire et de nombreux médiateurs chimiques qui peuvent être pro ou anti-inflammatoires et qui peuvent modifier ou entretenir la réponse inflammatoire.

La signalisation est réalisée grâce au chimiotactisme au niveau de la lésion entraînant le recrutement (diapédèse) de cellules particulières ayant pour rôle l'élimination des produits gênants. Celles-ci sont principalement les polynucléaires neutrophiles et les monocytes. Ces derniers mûriront en macrophages

(**Descamps-Latscha et Witko-Sarsat, 1996**).

Les polynucléaires neutrophiles (PNN) sont formés à partir des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse. Leur maturation est régie par des cytokines ainsi que par le complément. L'organisme crée continuellement des neutrophiles, et accroît sa production en cas de besoin, pour en avoir toujours à disposition au vue de leur durée de vie courte (deux à trois jours). Les PNN agissent dans l'inflammation grâce à différents types de récepteurs de surfaces qui sont des récepteurs pour les molécules d'adhésions des cellules endothéliales, et des récepteurs chimiotactiques. L'activation de ces récepteurs entraîne la migration des PNN vers le site lésé. Ils entraînent également la synthèse de molécules d'adhésions et de radicaux libres oxygénés. Le troisième type de récepteurs sont les récepteurs pour les opsonines, ou les récepteurs Fc et les récepteurs du complément activé,

(**Descamps-Latscha et Witko-Sarsat, 1996**).

Suite à son activation, le PNN synthétise de nombreux composés qui seront stockés dans de nombreux lysosomes (granules primaires) et granules secondaires, granules qui donnent son aspect caractéristique à la cellule. Les granules primaires contiennent principalement deshydrolases acides et lysozyme. Dans les granules secondaires se trouvent du lysozyme et de la lactoferrine (protéines antibiotiques) ; d'autres composés y sont aussi présents : cathepsine G, myéloperoxydase, protéinase-3,

chondroïtine-sulfate, héparine-sulfate, collagénase, phosphatase acide et alcaline, PAF (facteur activateur de plaquettes), eicosanoïdes (TXB2, LTB4, 5-HETE) et les radicaux libres oxygénés (**Eming et al., 2007**).

Les monocytes sont des cellules mononucléées circulantes qui migrent vers le site inflammatoire et se différencient en macrophages. Ils ont pour rôle de phagocyter l'agent agresseur ou les fragments de tissus altérés (**Descamps-Latscha et Witko-Sarsat, 1996**). Ils interviennent aussi dans l'amplification de la réaction inflammatoire en libérant des médiateurs stimulant d'autres cellules inflammatoires. Les monocytes interviennent également dans la phase de réparation tissulaire (**Eming et al., 2007**).

Les plaquettes sanguines sont indispensables à l'hémostase primaire. Elles contribuent au processus inflammatoire par la libération de nombreux médiateurs comme le fibrinogène, le plasminogène, des protéases plasmatiques ainsi que de la sérotonine (**Steinhubl, 2007**).

Les Polynucléaires basophiles sont les plus rares des polynucléaires (moins de 1 % des cellules inflammatoires). Elles présentent également un cytoplasme qui contient de très nombreuses granulations riches en médiateurs pro-inflammatoires. Les basophiles sont des cellules phagocytaires qui interviennent principalement dans les réactions allergiques (**Rankin, 2004**).

Les polynucléaires éosinophiles représentent de 1 à 6% des cellules inflammatoires. Elles possèdent aussi des propriétés phagocytaires (**Rankin, 2004**). Leur fonction principale est de s'attaquer aux parasites via le contenu de leurs granules. Elles interviennent aussi dans la modulation et la propagation de la réponse immunitaire adaptative en activant directement les lymphocytes T (**Hogan et al., 2008**).

Pour les médiateurs plasmatiques, les composants des systèmes multi protéiques sont produits à distance du foyer inflammatoire. Les différents composants de ces systèmes sont présents dans le sang circulant où ils demeurent à l'état de précurseurs inactifs, jusqu'à ce qu'ils soient mis en présence d'un activateur spécifique. Ces systèmes ont entre eux des relations fonctionnelles étroites (**Botting et Botting, 2000**) (**Tableau 1**).

Tableau 1:Origines cellulaires et effets des principaux médiateurs inflammatoires.
(Rankin,2004; Male *et al.*,2007).

Médiateurs	Origine	Actions
Histamine	Mastocytes, basophiles, éosinophiles et plaquettes.	Assure la vasodilatation, augmente la perméabilité vasculaire, induit l'expression des molécules d'adhésion sur l'endothélium vasculaire.
Sérotonine	Mastocytes et plaquettes.	Augmente la perméabilité vasculaire, dilate les capillaires et stimule la contraction des muscles lisses.
Facteur activateur des plaquettes (PAF)	Plaquette, neutrophiles, monocytes et cellules endothéliales.	Assure la vasodilatation, augmente l'adhésivité de la paroi vasculaire, stimule la broncho constriction, l'agrégation des plaquettes et la libération des médiateurs qu'elles renferment, induit la production des EOR et la libération des enzymes lysosomiales par les neutrophiles, les éosinophiles et les macrophages.
Kalicroïne	Présente dans le plasma	Transforme et active le système des Kinines
Plasmine	Présente dans le plasma	Clive le composant du complément C3 pour générer le C3a et le C3b
Leucotriènes : LTC4, LTD4, LTE4	Essentiellement par les leucocytes	Augmentent la perméabilité des micro-vaisseaux.
LTB4	Essentiellement par les leucocytes	Augmente la perméabilité vasculaire et le flux sanguin local, induit la libération des enzymes lysosomiales et la production des EOR et attire et active les cellules inflammatoires.
Prostaglandine E2	Essentiellement par les leucocytes	Provoque la vasodilatation, renforce l'action de l'histamine, de la bradykinine et des leucotriènes, augmente la sensibilité des neurones et est responsable de la douleur.
Bradykinine	Présente dans le plasma sous forme de kininogènes.	Accroît la vasodilatation, la perméabilité vasculaire et stimule la contraction des muscles lisses.
Facteur de Hageman (XII)	Présent dans le plasma et est activé par l'adhésion des plaquettes.	Impliqué dans la cascade de coagulation.
Thrombine	Présente dans le plasma	Catalyse la transformation du fibrinogène en fibrine et induit la libération de la sérotonine des plaquettes.

Fibrine	Présente dans le plasma, formé à partir du fibrinogène	Intervient dans la formation du caillot sanguin.
IL-8	Monocytes, macrophages, plaquettes et lymphocytes.	Active le chimiotactisme des neutrophiles, des monocytes et des macrophages. Induit la libération des enzymes lysosomiales et la production des EOR. Intervient dans la réparation tissulaire
C3a	Fraction C3 du complément inactif.	Provoque la dégranulation des mastocytes.
C5a	Fraction C5 du complément inactif	Provoque la dégranulation des mastocytes et des neutrophile, exerce un effet chimiotactique en vers les phagocytes et stimule la contraction du muscle lisse

La résistance bactérienne aux agents antimicrobiens est un problème d'importance croissante en pratique médicale. Si l'apparition des premiers antibiotiques (sulfamides en 1935 puis pénicilline au lendemain de la Seconde Guerre Mondiale) avait suscité un espoir de voir les maladies infectieuses à jamais jugulées, ce dernier fut déçu très rapidement par l'apparition de bactéries résistantes,

(Billing et Sherman, 1998 ; Vaubourdolle, 2007).

La sensibilité ou la résistance à un antibiotique est généralement évaluée au laboratoire par la méthode de l'antibiogramme. Cette technique permet d'apprécier l'activité bactériostatique d'un ou de plusieurs antibiotiques vis-à-vis d'une bactérie. La lecture de l'antibiogramme d'un germe permet de déterminer l'expression phénotypique de la résistance de ce germe à un ensemble d'antibiotiques, et par là même de suspecter le ou les mécanismes de résistance **(Vaubourdolle, 2007).**

La montée des résistances contre les principales classes d'antibiotiques, combinée au nombre limité d'agents en cours de développement, a conduit à l'avènement de l'ère post-antibiotique. Face à la perte d'efficacité de l'antibiothérapie, mise en péril par l'émergence de germes multi-résistants, la découverte de nouvelles molécules est devenue une nécessité absolue. Les champs d'investigation sont vastes. Toutefois, deux grandes stratégies, recourant aux progrès de la modélisation moléculaire, de la biologie moléculaire, de la génomique et de la protéomique, se dessinent dans le domaine de la recherche **(Guinoiseau, 2010).**

Les ressources naturelles sont donc à nouveau exploitées pour mener à terme de telles recherches. Actuellement, l'accent est mis sur l'exploration de nouveaux réservoirs naturels, comme les peptides antimicrobiens, qui montrent déjà des résultats prometteurs. Les ressources plus anciennes, comme les bactériophages ou les plantes, suscitent également un regain d'intérêt.

Les plantes synthétisent plus de 100 000 petites molécules dotées pour la plupart d'une activité antibiotique. En général, cette activité est inférieure à celle exercée par les antibiotiques d'origine microbienne (**Tegos *et al.*, 2002 ; Lewis et Ausubel, 2006**). Les concentrations requises pour exercer une activité antimicrobienne sont donc plus élevées pour les molécules isolées de plantes que pour celles issues de bactéries et de champignons. En effet, une molécule phytochimique est considérée comme « antimicrobienne » si elle inhibe la croissance des micro-organismes pour des concentrations minimales inhibitrices (CMI) comprises entre 100 µg/ml et 1000 µg/ml. Pour les antibiotiques d'origine microbienne, des CMI, variant de 0.01 µg/ml à 10 µg/ml, suffisent à générer une activité inhibitrice (**Tegos *et al.*, 2002**).

Les plantes ont plusieurs stratégies pour contrôler les infections bactériennes. La synthèse d'un grand nombre de molécules faiblement actives, plutôt que de puissants antibiotiques, en fait partie. Cette stratégie semble d'ailleurs utilisée pour diminuer la pression sélective, qui favorise le développement des résistances. Toutefois, l'activité de ces antibactériens peut être potentialisée lorsqu'ils agissent en synergie avec d'autres molécules. La preuve a été fournie par les interactions établies entre deux composés produits par les plantes *Berberis* sp. : la berbérine et la 5'-méthoxyhydnocarpine (5'-MHC), (**Guinoiseau, 2010**).

Les molécules dotées d'un effet anti-inflammatoire dans les plantes sont principalement les polyphénols, les stérols et les terpènes (**Adedapo *et al.*, 2009**).

Les polyphénols constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal rencontrées dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Les polyphénols sont des métabolites secondaires, ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance, ou la production (**Fleuriet, 1982 ; Yusuf, 2006**).

L'expression de « composés phénoliques » est utilisée pour toutes substances chimiques possédant dans sa structure un noyau aromatique, portant un ou plusieurs

groupements hydroxyles (**Figure 5**) (**Bloor, 2001**). Un nombre considérable de ces composés sont formés de deux noyaux benzéniques A et B reliés par un hétérocycle de type pyrane. Ces composés diffèrent les uns des autres par la position des substitutions sur les noyaux A et B, par la nature de l'élément central et par la position, la nature et le nombre de molécules de sucre fixées ainsi que par la nature de la liaison hétérosidique (**Dacosta, 2003**).

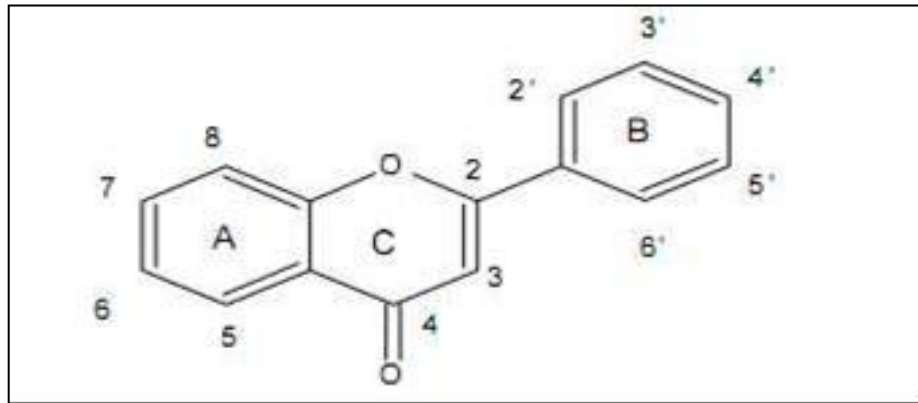


Figure 5: Squelette de base des composés phénoliques (**Girotti-Chanu, 2006**).

Les polyphénols sont des produits de la condensation de molécules d'acétyl-coenzyme A et de phénylalanine. Cette biosynthèse a permis la formation d'une grande diversité de molécules qui sont spécifiques d'une espèce de plante, d'un organe, d'un tissu particulière.

Selon Harborne (1980) on peut distinguer les différentes classes des polyphénols en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure de squelette de base. Quatre principales classes sont largement répandues :

- Les acides phénoliques (acides hydroxybenzoïques, acides hydroxycinnamiques) ;
- les flavonoïdes ;
- les tanins et lignines ;
- plus rares, les coumarines, les stilbènes.

L'intérêt thérapeutique potentiel des polyphénols date de la découverte de la vitamine C par SzentGyorgyi (Prix Nobel 1937). Au cours des années quatre-vingts, c'est la découverte du rôle des radicaux libres dans les processus pathologiques qui a relancé l'intérêt pour les polyphénols dont les propriétés antioxydantes sont remarquables.

Ils jouent ainsi un rôle important dans la qualité organoleptique des fruits et légumes, utilisés frais ou après transformation industrielle.

Les composés phénoliques possèdent souvent une activité antimicrobienne (Maillard, 1996). Ainsi, il a été montré que les catéchines des feuilles du thé inhibent la croissance de micro-organismes en altérant des fonctions membranaires des pathogènes, les détruisant à plus ou moins long terme (Fukai *et al.*, 1991).

Les propriétés biologiques des polyphénols sont essentiellement établies *in vitro* et découlent de leur activité réductrice et de leur affinité pour une grande variété de protéines (enzymes, récepteurs, facteurs de transcription).

De nos jours, les propriétés des polyphénols sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités anti-virales, anti-tumorales, anti-inflammatoires, anti-allergiques et anti-cancers. Ils ont également des actions positives sur l'obésité, le diabète, les maladies d'Alzheimer et de Parkinson.

Les activités biologiques des polyphénols ont souvent été évaluées *in vitro*, avec des protéines purifiées, des extraits cellulaires et des cellules entières en culture.

La signification de ces effets biologiques dans le domaine de la nutrition humaine est encore loin d'être établie d'autant qu'ils mettent presque toujours en jeu les formes natives ou aglycones de polyphénols et non pas les formes conjuguées circulantes. Pour progresser dans la démonstration *in vivo* des effets sur la santé des polyphénols, une meilleure connaissance de la biodisponibilité des polyphénols et une combinaison d'études cliniques pertinentes est indispensable. Le développement récent de nouveaux outils et méthodes pourrait permettre des avancées importantes dans les années à venir, le cas de la nutriginomique qui vise à mettre en évidence les gènes dont l'expression est régulée (à la hausse ou à la baisse) par les composants de l'alimentation. La difficulté réside ensuite dans l'analyse et l'interprétation de ces données biologiques complexes.

Plusieurs effets sont attribués à l'influence des acides phénoliques comme l'effet antiallergique ; sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes, telles que l'AMP cyclique phosphodiesterase et ATPase Ca²⁺-dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des mastocytes et des basophiles. Par exemple, l'ATPase Ca²⁺-dépendante dégrade l'ATP produisant ainsi de l'énergie afin de faciliter l'absorption du calcium par les membranes cellulaires, ce qui favorise la libération de l'histamine stockée dans les vésicules. En inactivant cette enzyme, la quercétine a montré un potentiel d'action supérieur à celui du cromoglycate de sodium

utilisé comme médicament en empêchant la libération de l'histamine et d'autres substances endogènes qui causent l'asthme. (Di Carlo *et al.*, 1999).

L'étude de Landolfi *et al.* (1984) a montré que certains polyphénols comme substance anti-inflammatoire, sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique dans les plaquettes. Les effets de la quercétine et de la myricétine sont dose-dépendants : à de fortes concentrations, ils inhibent la cyclooxygénase et la lipoxygénase. Cependant, à de faibles concentrations, seule la lipoxygénase est affectée. En revanche, d'autres flavonoïdes tels que l'apigénine et la chrysine agissent principalement sur l'activité de la cyclooxygénase.

Il est intéressant de noter que de nombreux flavonoïdes sont capables de contrer cette production d'espèces oxygénées par les neutrophiles (Limasset *et al.*, 1993).

Dans des expériences réalisées sur des rats, il a été démontré que la quercétine et la naringénine jouent un rôle important dans la réduction de l'ulcère et la protection des cellules gastriques. Il a été suggéré que la quercétine exerce son activité via un mécanisme complexe impliquant la production du mucus, le piégeage des radicaux libres et également l'inhibition de la production leucotriènes (Di Carlo *et al.*, 1999).

Chapitre 2 : *Ephedra alata alenda*

1. Généralités sur la plante

1.1. Genre *Ephedra*

L'origine de l'*Ephedra* a parfois été considérée comme ancienne, peut-être dès ou avant l'éclatement de la Pangée (environ 200 millions d'années passant dans le Trias moyen) (**Huang et Price, 2003**).

La famille des Ephedraceae représentée par le seul genre *Ephedra*, inclue environ 40 espèces dans le monde (**Evans, 2009**). Elle est représentée par des arbustes dioïques vivaces à rameaux articulés, qui peuvent atteindre 1 à 3 mètre, de haut, avec de minces tiges dressées, verts jaunâtres, intersectées et légèrement nervurées, à canalicules de 1,5 mm de diamètre et qui se terminent par une pointe souvent acérée. Au niveau des nœuds, qui sont écarté, de 4 à 6 cm, les feuilles, réduites en écailles, apparaissent triangulaires et se développent en paires opposées ou en verticilles de trois, donnant à la plante l'aspect d'un arbuste sans feuilles. De petites fleurs apparaissent en été (**Limberger et al., 2013; Ozenda, 1991; Abourashed et al., 2003**). Les espèces de ce genre peuvent pousser dans des conditions semi-arides et désertiques, ce qui rend les six continents appropriés pour leur croissance. Elles se développent habituellement dans des sols sableux, des pentes sèches et des côtés secs de montagnes (**Limberger et al., 2013**). Elles poussent surtout en Chine, en Inde, en Egypte, au Moyen-Orient, en Europe et dans les Amériques (**Hegazi et El-Lamey, 2011**). La figure 6 montre la répartition du genre *Ephedra* dans le monde.

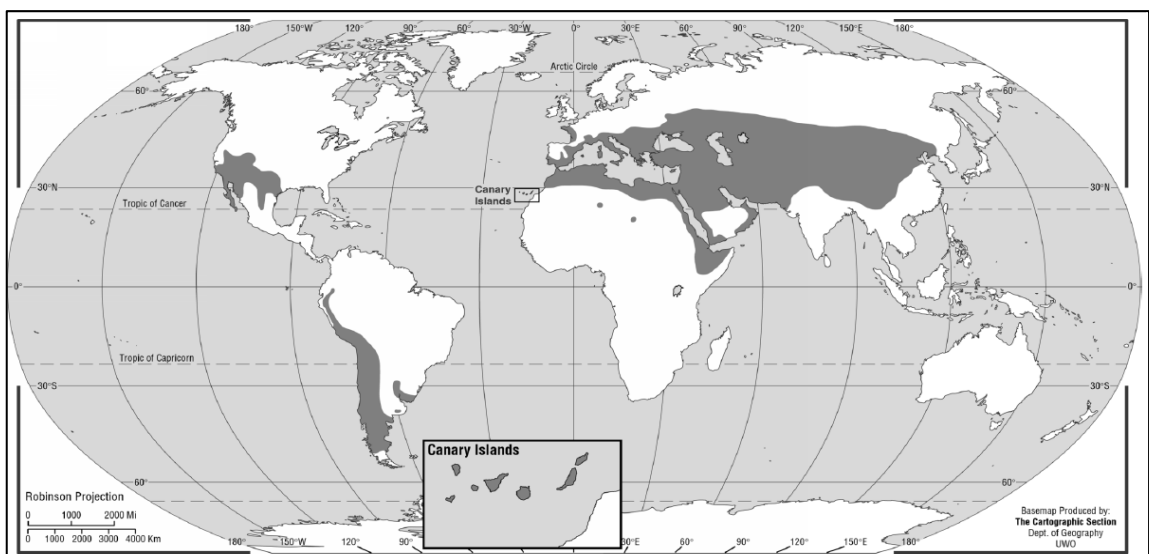


Figure 6: Répartition géographique de l'*Ephedra* dans le monde (**Caveney et al., 2001**).

2. Sous espèce *Ephedra alata alenda*

2.1. Classification systématique d'*Ephedra alata* (Ozenda, 1991)

Embranchement : Spermaphytes ;

sous embranchement: Gymnospermes ;

classe : Gnetopsida ;

ordre : Ephedrales ;

famille : Ephedraceae ;

genre: *Ephedra* ;

espèce : *Ephedra alata* ;

sous espèce:*Ephedra alata alenda*.

2.2. Description botanique

Cette espèce, qui est réputée pour sa tolérance élevée à la carence en eau dans les régions sahariennes (Ozenda, 1991 ; Derbel *et al.*, 2010). Est un arbuste de 1 à 3 mètres de haut, à rameaux articulés et très ramifiés d'une couleur vert-jaunâtre, portant au niveau des nœuds de petites feuilles opposées, alternant d'un nœud à l'autre (Figure 7). Les fleurs sont en petits cônes blanchâtres, dioïques (fleurs mâles et femelles sur des pieds différents) et les fruits entourés de bractées largement membraneuses. Elle présente un système de racines latérales extrêmement puissant (Ozenda, 1991;Derbel *et al.*, 2010).



Figure 7: Photo de la plante *Ephedra alata alenda* (Ozenda, 1991).

2.3. Répartition géographique

L'espèce *Ephedra alata* est une plante médicinale appartenant au genre *Ephedra* originaire d'Asie, y compris l'Arabie Saoudite (Al-Qarawi *et al.*, 2011). Elle est commune dans le Sahara du Maroc à la Libye jusqu'à l'Égypte et l'Arabie (Ozenda, 1991). En Algérie, *E. alata* se trouve dans le Sahara septentrional et occidental au niveau des terrains sableux, des regs et les lits sablonneux des oueds. Elle est même rencontrée dans le sable de l'étage tropical et la Hamada de Tinghert (Ozenda, 1991).

2.4. Utilisation

Les espèces du genre *Ephedra* sont parmi les plus anciennes herbes médicinales connues de l'humanité. *E. sinica* est l'espèce principale qui a été utilisée en Chine depuis plus de 5000 ans. *E. gerardiana* a aussi été utilisée dans la médecine traditionnelle indienne depuis l'ancien temps. Même durant le temps de l'empire Romain, l'*Ephedra* était bien connue (Abourashed *et al.*, 2003). Ma-huang est le terme spécifique donné par les chinois à la partie aérienne des espèces contenant de l'éphédrine (Abourashed *et al.*, 2003). Ma-huang a été traditionnellement utilisé en Chine pour lutter contre l'asthme bronchiale, rhume, grippe, fièvre, frissons, rhinite, congestion nasale, œdème, maux de tête, arthralgies et comme diaphorétique, antiallergique et antitussif (Abourashed *et al.*, 2003; Soni *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2007).

Les espèces *Ephedra* d'Asie ont été récemment utilisée dans la fabrication clandestine d'une drogue de rue, laméthamphétamine (d-desoxy-éphédrine) (Caveney *et al.*, 2001).

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

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

Au Maroc, *Ephedra alata* est utilisée pour lutter contre le diabète (Ghourri *et al.*, 2013).

En Algérie, *E. alata* s'utilise contre la grippe, la coqueluche et la faiblesse générale en tisane et par inhalation ainsi que sous forme de gouttes nasales contre les rhumes (Ould El Hadj *et al.*, 2003). Elle est très appréciée par le dromadaire.

Les organes utilisés dans la médecine traditionnelle sont les tiges vertes séchées, qui sont usuellement bouillies dans de l'eau pendant environ trente minutes et administrées comme thé chaud (Abourashed *et al.*, 2003).

En dépit de sa longue histoire et sa promesse agronomique, l'utilisation de l'herbe a diminué au fil des ans, mais au début du vingtième siècle, l'importance de l'herbe a graduellement revécu comme il est démontré par sa large utilisation aux Etats Unis dont beaucoup de produits contenant de l'*Ephedra*, vendus sous des noms tels que "Herbal Ecstasy and Escalation" sont supposés être efficaces pour la perte de poids et l'amélioration des performances physiques (Abourashed *et al.*, 2003; Caveney *et al.*, 2001).

2.5. Pharmacologie

Les effets pharmacologiques et toxicologiques de cet arbuste semblent être attribuables à ses alcaloïdes de types éphédrine, principalement (-) éphédrine et (+) pseudoéphédrine. L'Ephédrine, malgré l'absence de groupement phénolique caractéristique des catécholamines, est un sympathomimétique, agoniste à la fois des récepteurs adrénérgiques α et β . Elle présente aussi un effet indirecte sur le système

sympathique via l'augmentation de la libération de noradrénaline à partir des vésicules de stockage dans les neurones sympathiques vers la zone synaptique où il se fixe sur les récepteur post-synaptiques α et β (**Limberger et al., 2013; Ma et al., 2007**).

L'effet principal de la stimulation des récepteurs adrénergiques α et β inclue l'augmentation de la fréquence cardiaque et la contractilité. Elle favorise également la vasoconstriction périphérique due à la fraction pseudoéphédrine, la bronchodilatation, ce qui explique son utilisation traditionnelle comme décongestionnant nasal et antiasthmatique, ainsi que la stimulation du SNC (**Abourashed et al., 2003 ; Phinney et al., 2005**). Cependant, les effets hypertenseurs et vasoconstricteurs liés à l'éphédrine, sont moins rapides et moins puissants, mais plus durables et plus stables dans les conditions du métabolisme contrairement à l'adrénaline. C'est pour cela que l'administration de l'éphédrine, qui semble le majeur principe actif de la plupart des espèces *Ephedra*, est contre indiqué chez les patients atteint d'hypertension ou toute autre MCV, de glaucome, ou de l'hyperthyroïdie (**Chen et al., 2010**).

2.6. Toxicologie

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

3. Travaux antérieurs

3.1. Activités biologiques de la plante

3.1.1. Activité antimicrobienne

Ephedra alata s'est révélée avoir une activité antivirale élevée contre le HSV (Herpès simplex virus) (**Mohamed Soltan et Kamal Zaki, 2009**). L'extrait aqueux de *E. alata* égyptienne présente un potentiel d'inhibition significatif *in vitro* et *in vivo*

contre la croissance et la production d'aflatoxines par *Aspergillus flavus* (Al-Qarawi *et al.*, 2011). Ghanem et El-Magly (2008) ont montré que l'extrait acétonitrile de *l'E.alata* d'Egypte présente simultanément, une forte activité contre des bactéries GRAM+ et GRAM- ainsi que des champignons et champignons de type levure. *L'E.alata* de la région d'Ouargla testé par Kessal et Bouafia (2003) et Chebouat *et al.* (2014) s'est révélée avoir des activités plus ou moins importantes sur la croissance de bactéries GRAM positif et GRAM négatif selon la souche ciblée.

3.1.2. Effet sur la masse corporelle

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

3.1.3. Effet hypoglycémiant

Cinq glycanes actifs isolés de *E.distachya*: Ephedranes A, B, C, D et E ont réduit significativement le taux de glucose sanguin chez des souris normales et diabétiques (Konno *et al.*, 1985). Ainsi que l'extrait alcoolique de *l'E.alata* a présenté un abaissement persistant du taux de glucose sanguin une heure après son administration à des rats à jeun.

3.1.4. Effet anti-inflammatoire

L'extrait aqueux de *l'E.sinica* présente une propriété inhibitrice de complément à la fois dans le sérum animal et humain. Ceci pourrait expliquer l'utilisation de la plante dans la médecine chinoise traditionnelle dans le cas de néphrite aigue (Ling *et al.*, 1995). Par ailleurs, Hikino *et al.* (1980) ont suggéré que la pseudoéphédrine est le principe actif responsable de l'activité anti-inflammatoire montrée par *l'E.intermedia*. Konno *et al.*(1979) ont rapporté que la partie aérienne des espèces d'*Ephedra* contient de l'Ephedroxane qui s'est révélée également posséder une activité anti-inflammatoire.

3.1.5. Action sur la pression artérielle

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

3.2. Chimie de la plante

Les espèces de l'*Ephedra* sont des sources naturelles de nombreux phytoconstituants incluant des alcaloïdes, des tanins (principalement les pronthocyanidines), des saponines des acides phénoliques, des flavonoïdes (la vicénine II, la leucine III, le kaempferol 3- rhamnoside, la quercétine 3 - rhamnoside et l'herbacétine 7-O-glucoside sont les flavonoïdes qui ont été isolés de l'*Ephedra alata*), et des huiles essentielles (**Hegazi et El-Lamey, 2011**).

Il est bien connu dans la littérature que les propriétés biologiques traditionnelles de l'*Ephedra* sont attribuables en grande partie aux alcaloïdes de type éphédrine, proto-alcaloïdes dérivés de la phénylalanine (**Caveney et al, 2001**). Notons que la (-) éphédrine et l'(+) pseudoéphédrine sont généralement les plus abondantes, ils représentent environ 80% de la teneur en alcaloïdes dans la plante séchée (**Phinney et al., 2005; Soni et al., 2004; Caveney et al., 2001**).

Plus de 50 espèces d'éphédra sont originaires de deux hémisphères, mais la détection des alcaloïdes de la série de l'éphédrine a été limitée à des espèces en Eurasie dont l'*Ephedrasinica* est la principale source, tandis que les espèces américaines telle que *E. nevadensis* connue comme Mormon ou le thé du désert sont considérées comme dépourvues de ces métabolites (**Limberger et al., 2013; Abourashed et al., 2003**).

Néanmoins, ce type d'alcaloïdes ne représente pas les seuls alcaloïdes identifiés dans la plante. Il existe d'autres types d'alcaloïdes mineurs isolés à partir de différents espèces d'*Ephedra*.

A. Flavonoïdes

Les flavonoïdes des espèces de l'*Ephedra* comprennent principalement des diglycosylflavones, flavonol-3-O-glycosides et proanthocyanidines (Nawwar *et al.*, 1984). Le flavonoïde glycosylé, herbacétin 7-O-neohesperidoside ainsi que plusieurs autres flavonoïdes tels que le symplocoside, la pollenitine B, le kaempferol 3-O-rhamnoside 7-O-glucoside et l'isovitexine 2-O-rhamnoside ont été identifiés à partir de l'extrait de l'espèce *Ephedra sinica* par Amakura *et al.* (2013). L'herbacétine 8-méthylether 3-O-glucoside-7-O-rutinoside, l'herbacétine 7-O-(6''-quinyl glucoside), la vicénine II, la lucénine III, le kaempferol 3-rhamnoside, la quercétine 3-rhamnoside et l'herbacétine 7-O-glucoside sont les flavonoïdes qui ont été isolés et identifiés de l'*Ephedra alata* (la plante entière). Aussi, l'herbacétin 7-O-glucoside a été rapporté dans l'espèce *E. lomatolepis* et l'herbacétine 8-méthylether 3-O-glucoside de *E. equisetina* (Nawwar *et al.*, 1984).

B. Tanins

Les tanins, principalement les proanthocyanidines, ont été caractérisés par des réactions colorimétriques. Ces composés sont produits en grande quantité dans les tiges de nombreuses espèces d'*Ephedra* appartenant aux deux continents, eurasien et américain (Zang *et al.*, 2013). Ces molécules contribuent au goût astringent de l'*Ephedra* (Soni *et al.*, 2004).

C. Huiles essentielles

Les principaux constituants de l'huile essentielle d'*E. sinica* signalés par Miyazawa *et al.* (1997) et Wang *et al.* (2006) sont l' α -terpinéol, le terpinen-4-ol, le linalool, le 2,3-dihydro-2-méthylbenzo-furanne, le cis-p-menth-2-ène-7-ol., le p-vinylanisole, le 3-méthyl-2-butén-1-ol, le phytol et le γ -eudesmol. En plus du tétraméthylpyrazine, qui a été approuvé ultérieurement comme alcaloïde.

Matériel et méthodes

1. Matériel biologique

1. 1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé correspond à la partie aérienne composée des rameaux et des feuilles de la plante *Ephedra alata alenda* (**Figure.8**).

La récolte a été effectuée le 16 février 2019 dans la région d'Oued Tabaregda (Chachar), dans la wilaya de Khanchela. Pour assurer la bonne conservation de notre plante, le séchage a été fait à température ambiante, à l'abri de la lumière et de l'humidité afin d'éviter la dégradation des principes actifs et le développement de moisissures tel que le préconisent **Catier et Roux (2007)**. Après séchage, les tiges ont été broyées par un broyeur électrique et stockées dans un endroit sec en vue de leurs analyses.



Figure 8: Aspect morphologique de l'espèce *Ephedra alata alenda*.

1.2. Matériel animal

L'étude de l'activité anti-inflammatoire est réalisée sur des souris males de la souche albinos Wistar pesant 25 ± 5 g, fournis par l'Institut de pharmacie de Constantine. Ces animaux sont élevés au niveau de l'animalerie de l'université de Guelma.

Les animaux, répartis en 4 groupes de 4 souris, sont hébergés dans des cages en polypropylène, à température ambiante ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) avec accès libre à l'eau et à l'aliment.

Après une période d'adaptation de 3 jours, les animaux sont pesés et marqués avant leur utilisation.

2. Méthodes

2.1. Préparation de l'extrait brut aqueux par Extraction Solide - Liquide (ESL)

Dans cette partie de travail, nous avons extrait les composés phénoliques totaux. Une quantité de poudre végétale est mise en contact avec l'eau chaude (infusion) pour nous rapprocher des préparations traditionnelles.

250g de la poudre végétale sont placés avec 2 litres d'eau distillée dans un cristalliseur. Le mélange est placé sous agitation pendant environ 3 heures d'ébullition. Après refroidissement, le mélange est filtré sur du coton, puis sur papier filtre. Le filtrat est concentré par un rotavapeur.

2.2. Pouvoir antioxydant de l'extrait brut

2.2.1. Piégeage du DPPH

Le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) fut l'un des premiers radicaux utilisés pour étudier la relation structure / activité antioxydante des composés phénoliques (**Beddou, 2015**). Depuis, certaines modifications ont été apportées et un paramètre important, l'IC50, a été introduit dont la détermination est définie comme étant la concentration en substrat entraînant une diminution de 50% de l'absorption. A cette concentration, 50% du DPPH• est sous forme réduite (**Brand-Williams et al., 1997**). Dans ce test, les antioxydants réduisent le diphényl-picrylhydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphényl-picrylhydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu réactionnel (**Sanchez-Moreno, 2002**).

Pour la mesure de cette activité, nous avons utilisé la méthode décrite par **Baghiani et al. (2012)**. Dans des tubes on a introduit 750 µl de l'extrait testé à différentes concentrations (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 et 1 mg/ml) et 1,5 ml de la solution méthanolique de DPPH (2,4 mg/100 ml). En parallèle, un contrôle négatif (sans extrait) est préparé. Après 60 min d'incubation dans l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 517 nm. À des fins comparatives, un antioxydant standard est utilisé : l'acide ascorbique (Vitamine C). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition donné par la formule :

$$I \% = [(AC - AE) / AC] \times 100$$

Où I % = Pourcentage d'inhibition; AC= Absorbance du contrôle négatif et AE = Absorbance de l'échantillon testé.

L'étude de la variation de l'activité anti-radicalaire en fonction de la concentration de l'extrait permet de déterminer la concentration qui correspond à 50% d'inhibition (IC50). Plus la valeur de l'IC50 est faible, plus l'extrait est puissant vis-à-vis des radicaux libres.

2.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne de l'extrait brut aqueux d'*Ephedra alata alenda* a été testée à différentes concentrations vis-à-vis de quelques microorganismes (bactéries, champignons).

2.3.1. Activité antibactérienne

Plusieurs études dans le monde ont signalé l'*Ephedra* comme une plante antimicrobienne (AL-Qarawi *et al.*, 2013; Mohamed Soltan et Kamal Zaki , 2009; Bussmanna *et al.*, 2008; Bussmanna *et al.*, 2010; Parsaeimehr *et al.*, 2010). Alors que Peu d'études sur le plan local ont été effectuées (Chebouat *et al.*, 2014., Kessal et Bouafia., 2003) et surtout aucune recherche n'a ciblé l'effet des parties aérienne (rameaux et feuilles réduites en écailles) et souterraine séparément. Nous avons donc décidé d'étudier la partie aérienne d'*Ephedra alata alenda* en testant l'activité de différents doses d'extraits sur deux souches bactériennes GRAM négatif et une souche GRAM positif.

Les trois souches testées, de référence ATCC, provenant du laboratoire de microbiologie de l'université de Guelma, sont: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.

2.3.1.1. Souches ciblées

A. *Escherichia coli*

C'est un bacille Gram négatif a bouts arrondis, isolé ou en courtes chainettes et parfois sous forme de très long filament. C'est un saprophyte normal du tube intestinal de l'homme et des animaux. C'est l'un des agents responsables de septicémies, de suppurations, de diarrhées et même de dysenteries (Kaper, 2004).

B. *Pseudomonas aeruginosa*

Cette bactérie Gram négatif aux extrémités arrondies, peut être groupée par paire ou en courtes chainettes. C'est un germe pathogène redoutable, résistant à de nombreux antibiotiques. Elle est fréquemment retrouvée dans le sol, l'eau, dans des cas d'otites, de méningites, d'endocardites ainsi que de nombreuses infections chez les patients immunodéprimés (**Morançais et Tavoukdjian, 2002**).

C. *Staphylococcus aureus*

Le staphylocoque doré ou *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) est une bactérie Gram positif groupée en amas ayant la forme de grappes de raisin, immobiles, non sporulés; il vit normalement sur la peau ou dans le nez des personnes infectées (**Le Loir et Gautier, 2009**).

2.3.1.2. Méthode de détermination de l'activité antibactérienne

L'extrait brut aqueux de l'*Ephedra alata alenda* a été dilué dans l'eau distillée à des concentrations de 50, 100, 150 et 200 mg/ml puis testés dans les un milieux solide.

L'activité antibactérienne de l'extrait a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé tel que préconisé par **Treki et al.(2009)**.

Les différentes souches bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures afin d'obtenir une culture jeune et des colonies isolées qui ont servi par la suite à préparer l'inoculum en les trempant dans des tubes de solution d'eau distillée stérile afin d'avoir une densité cellulaire initiale ou une turbidité voisine de 0,5 McFarland (10^8 UFC/ml).

Après l'ajustement de la turbidité de la suspension servant d'inoculum, on a trempé un écouvillon dans la suspension qu'on a étalée sur la surface entière de la gélose Mueller Hinton. Au cours de l'application, on a tourné la boîte de 90° environ en vue d'assurer une distribution homogène de l'inoculum.

Des disques de papier Wathman stériles (6 mm de diamètre) sont imprégnés d'extrait sec à concentrations croissantes repris avec de l'eau distillée, et appliqués à l'aide d'une pince sur la surface du milieu GMH. Les boîtes sont incubées à l'étuve à 37°C en position inversée durant 24 h (**Parsaeimehr et al., 2010**).

L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant, à l'aide d'une règle graduée, le diamètre de la zone d'inhibition.

2.3.2. Activité antifongique

Deux souches de champignons provenant du laboratoire de microbiologie de l'université de Guelma, sont testées: *Aspergillus niger* (Moisissure), *Candida albicans* (Levure).

A. *Aspergillus niger*

Est l'un des microorganismes les plus importants utilisés en biotechnologie. Il est utilisé depuis plusieurs décennies déjà pour produire des enzymes extracellulaire (alimentaire) et de l'acide citrique. De plus, *A.niger* est utilisé pour les bio-transformations et le traitement des déchets. *A.niger* a été développé au cours des deux dernières décennies en tant qu'hôte de transformation important pour la surexpression des enzymes alimentaires (Schuster *et al.*,2002).

B. *Candida albicans*

Est un agent pathogène opportuniste que l'on trouve couramment dans la microflore humaine. La capacité de *C.albicans* à modifier sa morphologie cellulaire a été associée à sa virulence; les cellules de levure sont plus fréquentes dans les interactions commensales alors que les cellules filamenteuses semblent importantes dans les infections opportunistes (Deborah *et al.*2004).

L'extrait brut aqueux de l'*Ephedra alata alenda* a été dilué dans l'eau distillée à des concentrations de 50, 100, 150 et 200 mg/ml sur milieu solide.

Le milieu de culture utilisé pour l'étude de l'activité des champignons est la gélose de Mueller Hinton. C'est un milieu utilisé pour le dénombrement des levures et des moisissures dans les produits alimentaires et les produits pharmaceutiques. Il convient également pour l'isolement et l'entretien de souches.

L'inoculum est préparé en prélevant quelques spores de la culture du champignon dans 100ml d'eau physiologique pour avoir un inoculum à 10^5 spores/ml.

Pour tester l'activité antifongique de nos extraits, nous avons adopté la méthode d'inondation, 500µl de la suspension fongique ont été prélevés et déposés sur la gélose d'extrait de malt puis bien étalé à l'aide d'une pipette pasteur incliné sous forme de râdeaux.

Les disques imprégnés de 20µl de chaque extrait sont déposés et les boîtes sont incubées pendant 2h à 4°C et par la suite à l'étuve à 25°C pendant 48h.

La lecture des résultats est réalisée par la mesure des diamètres des zones d'inhibition.

2.4. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire (Inflammation aigue) *in vivo*

Pour mettre en évidence l'activité anti-inflammatoire, un modèle expérimental d'inflammation aigue de la patte de la souris induit par le formol a été sélectionné. Des souris ont été mises à jeun 12 heures avant l'essai. Des œdèmes sont induits par l'injection subplantaire (intra articulaire) d'une solution de formol (5%) au niveau de la patte arrière droite des souris, une heure après l'administration des extraits par voie intra-péritonéale (i.p). L'inflammation causée sera diminuée en présence de l'extrait ayant une activité anti-inflammatoire (Ossipov *et al.*, 1995). Une heure avant l'injection du formol, un effectif de 16 souris pesant 25 ± 5 g est divisé en 4 groupes, chaque groupe reçoit par voie intra-péritonéale (i.p) les solutions expérimentales comme suit :

- **Groupe contrôle négatif (sain)** (n=4): reçoit une solution de NaCl (0,9%).
- **Groupe contrôle positif** (n=4) : reçoit par injection subplantaire 0,1 ml d'une suspension de formol à 5%
- **Groupe traité** (n=4): reçoit par injection subplantaire 0,1 ml d'une suspension de formol à 5% et traité par l'extrait aqueux *Ephedra alata alenda* à la dose de 200 mg/Kg
- **Groupe traité** (n=4): reçoit par injection subplantaire 0,1 ml d'une suspension de formol à 5% et traité par l'extrait aqueux d'*Ephedra alata alenda* à 400 mg/Kg.

Le volume d'œdème de la patte a été mesuré, à l'aide d'un micromètre digital avant et après induction de l'œdème à des intervalles d'une heure pendant quatre heures. Le pourcentage d'augmentation (% AUG) de l'œdème est calculé pour chaque groupe de souris. Il est donné par la formule suivante (Ossipov *et al.*, 1995):

$$\% \text{ AUG} = (\text{Dn} - \text{D0}) / \text{D0} \times 100$$

Dn : diamètre de la patte à la n^{ème} heure après l'injection du formol ; D0 : diamètre de la patte avant l'injection du formol.

Le pourcentage d'inhibition (INH %) de l'œdème est calculé pour chaque groupe de souris traitées par rapport au lot témoin. Il est obtenu par la formule suivante (Ossipov *et al.*, 1995):

$$\text{INH \%} = 100 \times (\% \text{AUG témoin} - \% \text{AUG traité}) / \% \text{AUG témoin}$$

2.4.1. Taux des cellules immunitaire (leucocytes, lymphocytes, granulocytes)

Le taux de globules blancs est calculé par la technique d’FNS (Formule Numération Sanguine). FNS est l'analyse des composants du sang. Elle est demandée couramment comme un outil permettant le diagnostic ou l'orientation de celui-ci.

2.4.2. Analyses statistique

Les résultats des tests effectués in vivo sont exprimés en Moyenne \pm SEM par un logiciel (Graph Pad. Prism. V 7.03). La différence entre le contrôle et les différentes doses est déterminée par le test one way ANOVA pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification. Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0,05 ($p < 0.05$).

I. Résultats

1. Activité antioxydante

1.1. Pouvoir de piégeage du radical libre DPPH.

L'évaluation de l'activité anti-radicalaire de notre extrait *via* le test DPPH^{*} a conduit aux résultats illustrés par la figure 9.

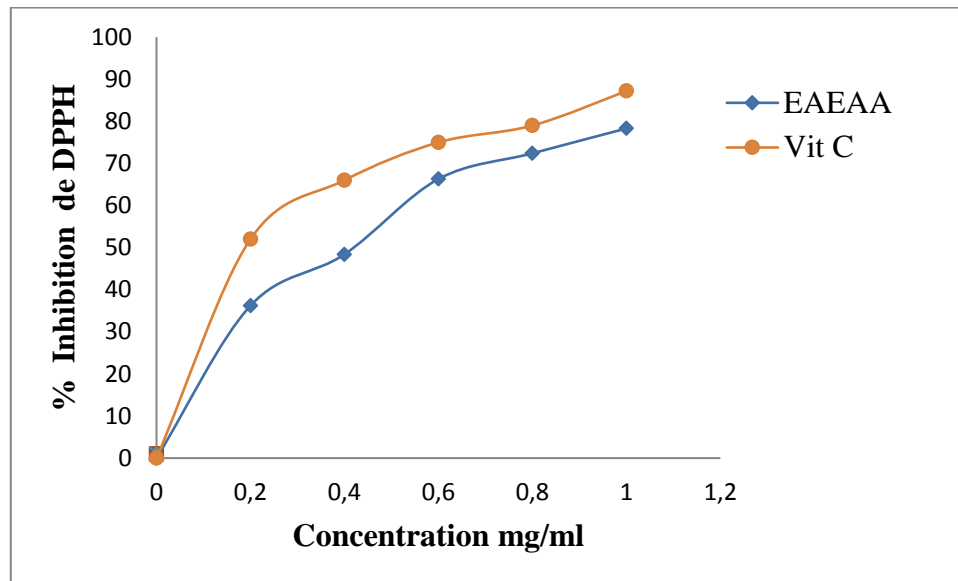


Figure 9 : Profil de l'activité anti-radicalaire (test DPPH^{*}) de l'extrait aqueux d'*Ephedra alata alenda*,

Les pourcentages d'inhibition correspondant à différentes concentrations de l'extrait (I%), sont présentés dans la figure 10. Les valeurs correspondantes des IC₅₀ (la concentration de l'antioxydant, nécessaire pour piéger 50% des radicaux libres) sont déterminées.

Le profil de l'activité anti-radicalaire révèle que l'extrait testé possède une activité dose-dépendante. L'extrait aqueux d'*Ephedra alata alenda*, a montré un pouvoir réducteur le plus important. À une concentration de 1 mg/ml, il atteint un pourcentage d'inhibition égal à 78,30%, alors que la vitamine C atteint une valeur de 87,2% à la même concentration.

Les valeurs des IC₅₀, présentées dans la figure, permettent d'évaluer et de comparer l'efficacité des extraits. Il est admis que plus la valeur de la IC₅₀ est faible plus l'extrait est puissant *vis-à-vis* des radicaux libres. On constate que les extraits les plus riches en composés phénoliques sont les extraits les plus actifs.

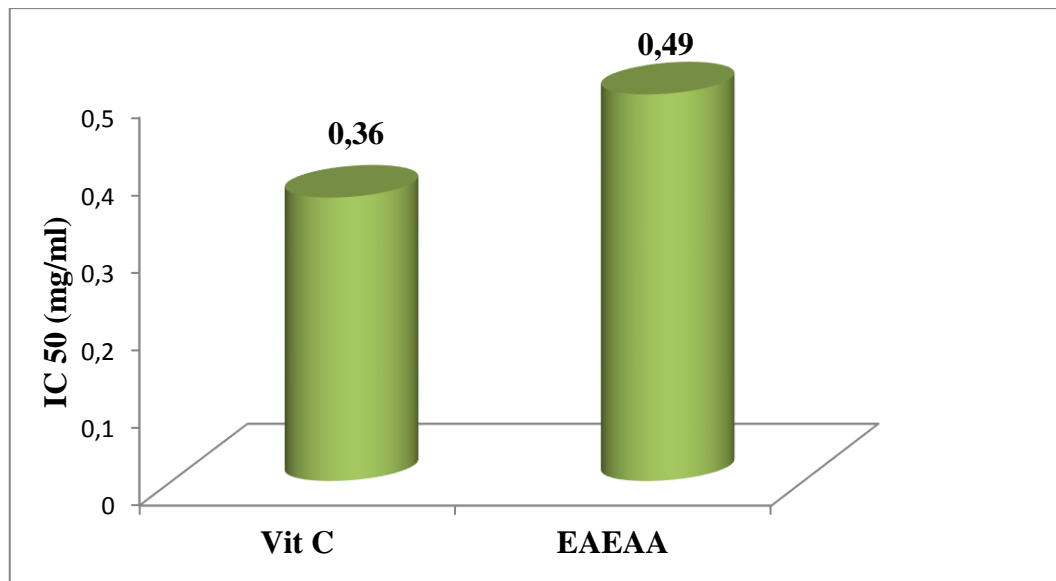


Figure 10: Résultats des IC₅₀ (exprimées en mg/ml) d'inhibition du DPPH de l'extrait brut. IC₅₀ = concentration d'extrait nécessaire pour diminuer 50% du taux des radicaux libres ; Vit c : acide ascorbique, EAEAA : extrait aqueux *Ephedra alata alenda*

La vitamine C présente un pouvoir anti-radicalaire très puissant par rapport à notre extrait. De toute façon, selon Moure *et al.* (2001), Les antioxydants naturels indiquent souvent un pouvoir antioxydant inférieur à celui des antioxydants synthétiques.

L'extrait aqueux d'*Ephedra alata alenda* présente une valeur importante de l'IC₅₀ (0.49 mg/ml) comparativement avec la Vitamine C (0.36 mg /ml) et donc une activité anti-radicalaire importante.

L'effet antioxydant, en piégeant le radical DPPH[•], est attribué soit à la capacité de libération d'hydrogène ou au transfert d'électrons par les composés antioxydants. (Ghasemi *et al.*, 2014; Popovici *et al.*, 2009). La corrélation constatée entre les résultats fournis par le test DPPH pour notre extrait signifie probablement que nos extraits exercent leurs effets antioxydants, en réduisant le DPPH[•] selon le même mécanisme en l'occurrence le transfert d'électrons.

2. Evaluation de l'activité antimicrobienne

2.1. Activité antibactérienne

Les résultats de l'activité antibactérienne testée par la méthode de diffusion sur disques en milieu gélosé a permis d'obtenir les résultats consignés dans la figure 11 et le tableau 2.

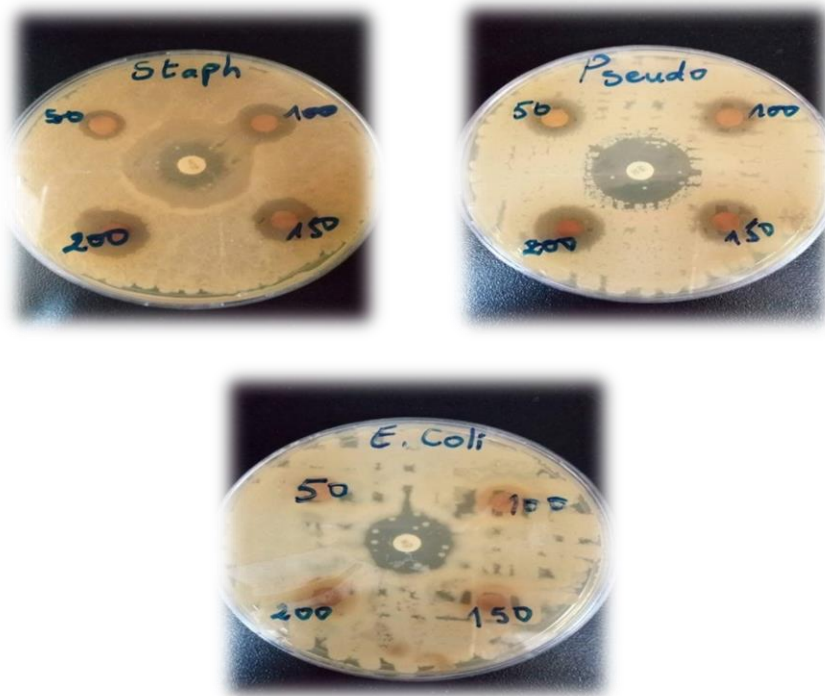


Figure 11 : Les zones d'inhibition exercées par l'extrait aqueux *Ephedra alata alenda* sur les souches bactériennes testées.

Tableau 2: Effet des différentes concentrations de l'extrait de *Ephedra alata alenda* sur les trois souches bactériennes (zone d'inhibition en mm)

Diamètre de zone d'inhibition (mm) de chaque germe testé / dose (mg/ml)	50	100	150	200
<i>Staphylococcus aureus</i> (Gram +)	17	20	25	32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Gram -)	10	12	14	16
<i>Escherichia coli</i> (Gram -)	10	12	14	15

Nos résultats illustrés par la figure, montrent que : *Staphylococcus aureus*, bactérie GRAM positif, est plus sensible de façon hautement significative par rapport aux deux autres souches *P.aeruginosa* et *E.coli*, bactéries GRAM négatif, qui présentent le même niveau de sensibilité.

Pour *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* (**Figure. 11**), les différentes concentrations de l'extrait forment entre elles un groupe homogène du point de vue pouvoir inhibiteur, c'est-à-dire qu'ils inhibent la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* avec la même puissance.

Les résultats montrent donc la résistance des bactéries GRAM négatif à notre extrait par rapport à la bactérie GRAM positif ciblée.

Selon Kessal et Bouafia (2003), l'extrait méthanolique de la plante entière de *E. alata* de la région de Ouargla, a montré des zones d'inhibition de 9.63 mm, 7.31 mm et 15.32 mm pour *E.coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus* respectivement. Les extraits AcOEt et DCM des fleurs et des feuilles toujours de *E. alata* de la région de Ouargla, ont montré que le meilleur pouvoir d'inhibition a été obtenu sur *S. aureus* comparativement à *E.coli* et *P. aeruginosa* (**Chebouat et al., 2014**).

L'extrait éthanolique d'*E. americana* du nord du Pérou a donné des zones d'inhibition de 22mm et 8mm, et des MIC de 32 et 64 mg/ml sur la croissance de *S.aureus* et *E.coli* respectivement (**Bussmanna et al., 2008; Bussmanna et al., 2010**). Dans les travaux de Parsaeimehr *et al.* (2010), le meilleur pouvoir inhibiteur de l'extrait méthanolique de la partie aérienne de trois espèces iraniennes d'*Ephedra* (*E. procera*, *E. strobilacea*, *E. pachyclada*) a été obtenu sur *P. aeruginosa*.

En effet, la plus grande résistance des bactéries GRAM négatif par rapport aux bactéries GRAM positif est un phénomène connu (**Gupta, 2011**) car en plus des mécanismes de résistance communs entre les deux groupes (l'inactivation directe de la molécule active par l'action de différentes enzymes, l'expulsion active des antibiotiques par les pompes à efflux et l'altération de la sensibilité à l'antibiotique par modification de cible (**Dzidic et al., 2008**), la membrane externe de l'enveloppe cellulaire des bactéries GRAM négatif semble constituer une barrière efficace à haut niveau de résistance (**Nikaido, 1994**). Au niveau de cette barrière, à la place du glycérophospholipide habituel des membranes biologiques ordinaires, on trouve le LPS (Lipopolysaccharide). Ce dernier forme, grâce à sa fraction polysaccharidique un réseau polaire autour de la bactérie empêchant ainsi la pénétration des molécules hydrophobes. De même, grâce à sa fraction lipidique (le lipide A) constituée de 6 à 7 molécules d'acides gras saturés, lui conférant ainsi une certaine

rigidité, les composés hydrophiles ne peuvent donc passer cette barrière qu'à travers des protéines canaliculaires de très petite taille remplies d'eau appelées les porines (Nikaido, 1994; Dzidic *et al.*, 2008). Cette voie utilisée par la cellule essentiellement pour apporter les nutriments du milieu extérieur, peut être exploitée aussi par les antibiotiques ; pour cela des mutations génétiques portées sur les chromosomes ou les plasmides diminuant le nombre de copies ou la taille de porines se produisent en vue d'augmenter le niveau de résistance (Dzidic *et al.*, 2008; Carattoli, 2009).

Malgré qu'à GRAM positive, *Staphylococcus aureus* est peut-être la bactérie pathogène de la plus grande préoccupation en raison de sa virulence intrinsèque, sa capacité à provoquer une large éventail d'infections menaçant la vie, et sa capacité à s'adapter à différentes conditions environnementales (Lowy, 2003). Aussi rapidement que de nouveaux antibiotiques sont introduits, les staphylocoques sont capables de devenir efficacement résistants (Herman et Dewulf, 2011).

2.2. Evaluation de l'activité antifongique

L'évaluation de l'activité antifongique des différentes concentrations de l'extrait aqueux de la plante *Ephedra alata alenda*, a été effectuée sur deux champignons (*Aspergillus niger* et *Candida albicans*).

Les résultats de l'activité antifongique, testée par la méthode de diffusion sur disques en milieu gélosé, a permis d'obtenir les résultats consignés dans la figure 12 et le tableau 3.

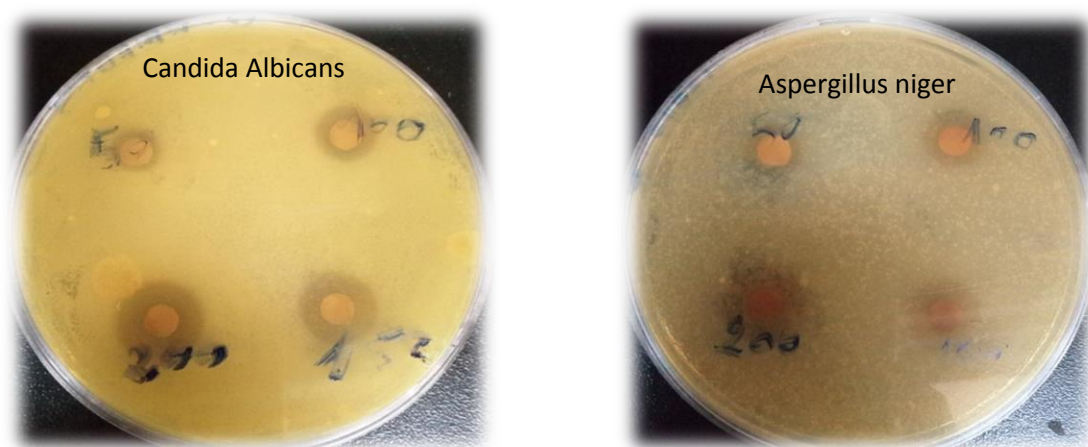


Figure 12 : Les zones d'inhibition exercées par l'extrait aqueux *Ephedra alata alenda* sur les souches fongiques testées.

Tableau 3: Effet des différentes concentrations de l'extrait de *Ephedra alata alenda* sur les deux champignons testé (zone d'inhibition en mm)

Diamètre de zone d'inhibition (mm) de chaque germe testé \ dose (mg /ml)	50	100	150	200
<i>Aspergillus niger</i> (Moisissure)	10	12	14	15
<i>Candida albicans</i> (Levure)	10	12	14	16

On remarque que l'extrait de *Ephedra alata alenda* est pourvu d'un effet inhibiteur sur les deux champignons testés (**tableau 3**). Cet effet est représenté par une activité contre *A.niger* et *C. albicans* avec des diamètres de 15 mm et 16 mm respectivement à la concentration de 200 mg/ml .

3. Activité Anti-inflammatoire *in vivo*

3. 1. Pourcentage d'augmentation du volume de la patte

3.1.1. Groupe contrôle

L'administration du formol entraîne une augmentation très significative ($p<0,01$) du pourcentage de l'augmentation du volume des pattes des souris du groupe contrôle positif (59.91%) en comparaison avec le groupe contrôle négatif (sain) à partir de la première heure de l'expérimentation. Cette augmentation est de plus en plus importante avec le temps. Elle est de 67.24 ; 84.48 et 60.77 % à la deuxième, troisième et quatrième heure respectivement (**figure 13**).

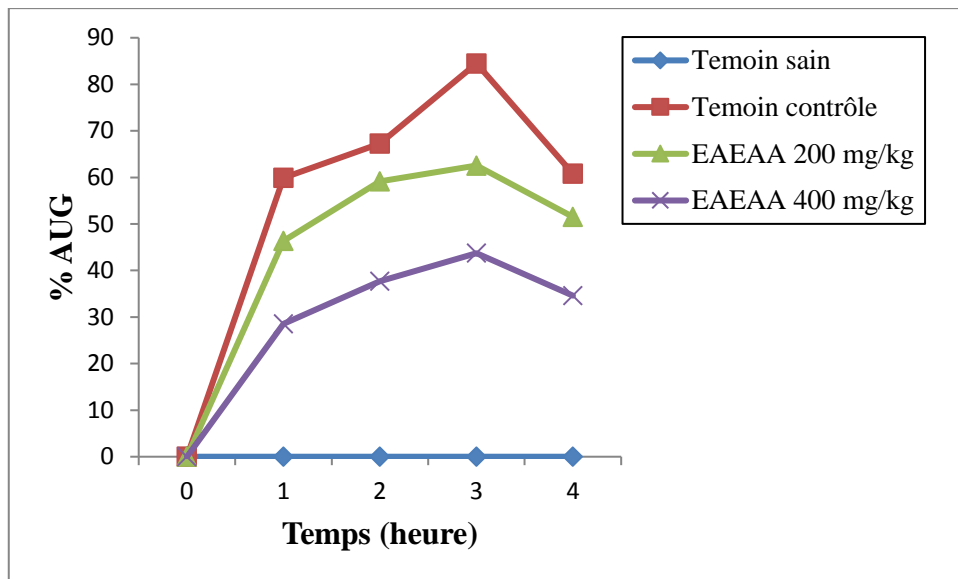


Figure 13: Pourcentage de l'augmentation du volume de la patte des groupes testés.

3.1.2. Groupes traités

Dès la deuxième heure du traitement par l'extrait aqueux d'*Ephedra alata alenda* aux doses de 200 et 400 mg/kg de p.c, une diminution significative ($p < 0,05$) est observée dans le volume des pattes des souris. Le pourcentage de réduction du volume est de 46.38 ; 59.14 ; 62.55 et 51.48% à la 1^{ère}, 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} heure respectivement, pour la dose 200 mg/kg, et 28.57 ; 37.66 ; 43.72 et 34.63 % pour la dose 400 mg/kg (**Figure 13**).

3.2. Pourcentage d'inhibition de l'œdème de la patte (%INH)

3.2.1. Groupe traité EAEAA (200 mg /kg)

L'administration intra-péritonéale de l'extrait aqueux d'*Ephedra alata alenda* à la dose de 200 mg/kg présente une activité inhibitrice significative ($p < 0,05$) de l'œdème de la patte des souris, estimée par 22.58 ; 12.04 ; 25.95 et à 15.28 % à la première, deuxième, troisième et la quatrième heure respectivement (**figure 14**).

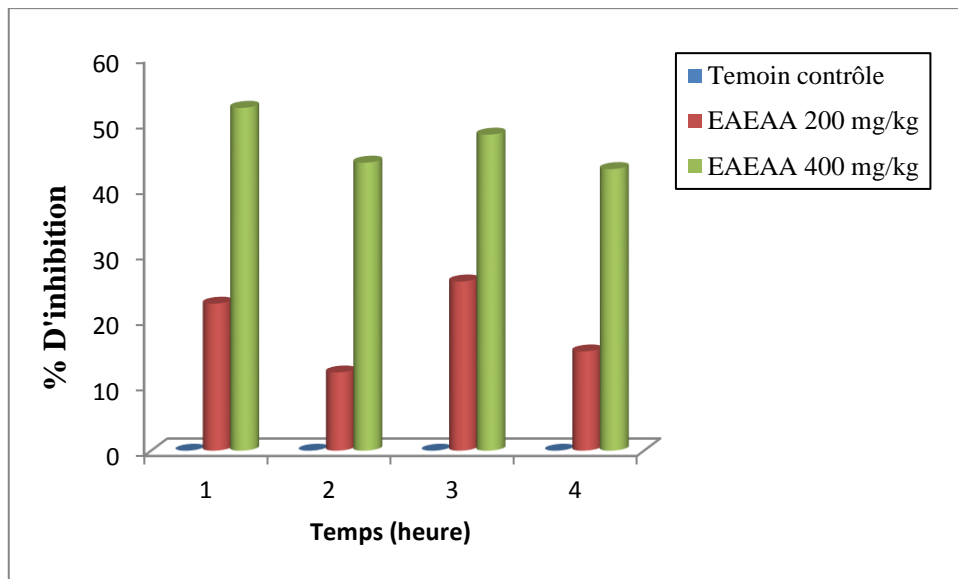


Figure 14: Pourcentage moyen d'inhibition de l'œdème des pattes droites des souris.
(n=4).

3.2.2. Groupe traité EAEAA (400 mg /kg)

À la dose de 400 mg/kg l'effet inhibiteur significatif de l'extrait d' *Ephedra alata alenda* administré par voie intra-péritonéale se manifeste dès la première, deuxième, troisième, et la quatrième heure qui suit l'injection du formol avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 52.31, 43.99, 48.24 et de 43.01 % respectivement (**Figure 14**).

3.3. Effet de l'extrait aqueux d'*Ephedra alata alenda* sur le taux des cellules immunitaires

Selon les résultats de la FNS une augmentation hautement significative ($p < 0.01$) du nombre des leucocytes chez le groupe contrôle positif ($8,5 \pm 0.51 \times 10^9 \text{ cell/L}$) par rapport aux contrôles négatifs (sains) $3.89 \pm 0.23 \times 10^9 \text{ cell/L}$ (**Figure.14**). Cette augmentation est due à une forte inflammation dans le corps. D'après la figure 14 une diminution non significative ($p > 0.05$) du nombre des leucocytes est obtenues chez les souris traitées par l'extrait aqueux (200 mg/kg) ; elle est de $7.8 \pm 0.23 \times 10^9 \text{ cell/L}$. Tandis que la dose de 400 mg/kg diminue significativement ($p < 0.05$) le taux des leucocytes ($5.42 \pm 0.62 \times 10^9 \text{ cell/L}$) comparativement avec le groupe contrôle positif.

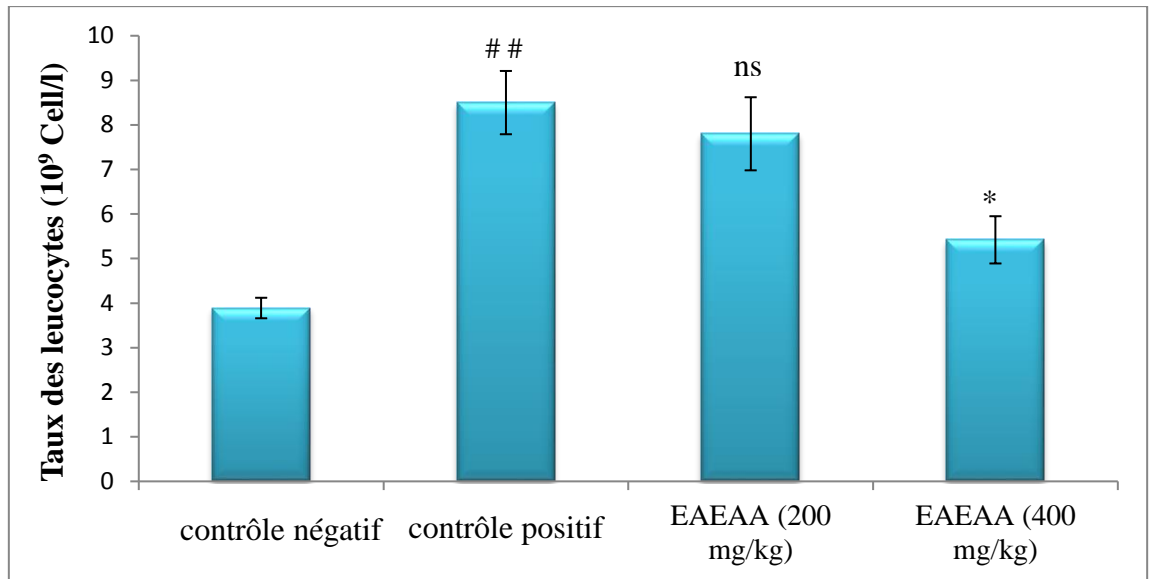


Figure 15: Taux des leucocytes chez les différents groupes traités. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM. EAEAA ; Extrait aqueux d'*Ephedra alata alenda*. ## $p < 0,01$ comparé au contrôle négatif ; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparé au contrôle positif ; (n=4).

Concernant le taux de lymphocytes, une augmentation hautement significative ($p < 0,01$) a été remarquée dans le groupe contrôle positif ($3.53 \pm 0.54 \times 10^9$ cell/L) par comparaison avec le groupe contrôle négatif ($1.86 \pm 0.16 \times 10^9$ cell/L) (**Figure 16**). Cependant une diminution non significative ($p > 0,05$) est enregistrée avec les deux groupes traités par l'extrait aqueux d'*Ephedra alata alenda* aux doses de 200 et 400 mg/kg, estimée à $3.22 \pm 0.55 \times 10^9$ et 2.97 ± 0.22 cell/L respectivement.

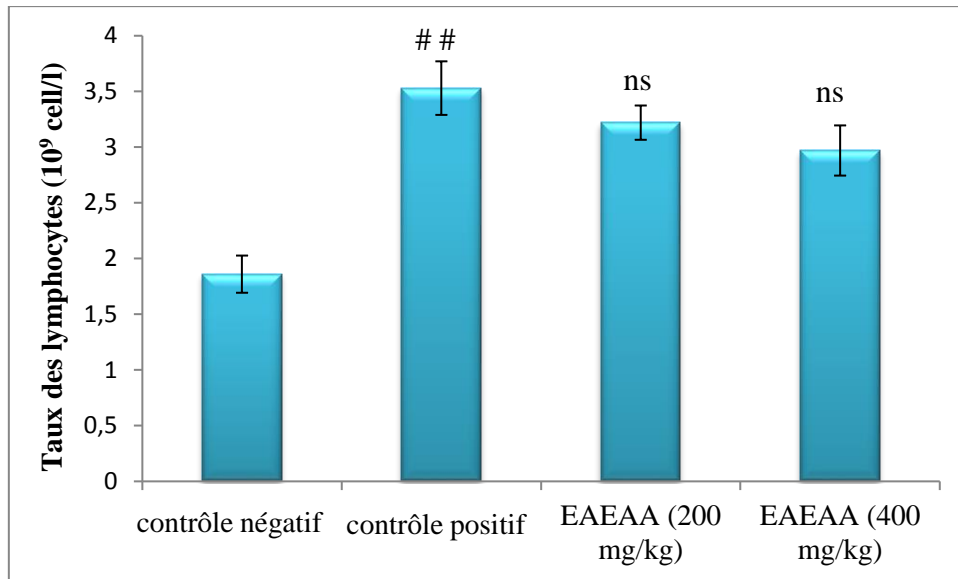


Figure 16: Taux de lymphocytes chez les différents groupes traités.

La figure 17 représenté le taux des granulocytes des différents groupes testés. Une augmentation très hautement significative ($p < 0,001$) a été remarquée dans le groupe contrôle positif ($4.33 \pm 0.71 \times 10^9$ cell/L) par comparaison avec le groupe contrôle négatif ($0.57 \pm 0.04 \times 10^9$ cell/L). Cependant une diminution significative ($p < 0,05$) est enregistrée avec les deux groupes traités par l'extrait aqueux d'*Ephedra alata alenda* aux doses de 200 et 400 mg/kg ; elle est estimée à 2.83 ± 0.29 et $2.53 \pm 0.31 \times 10^9$ cell/L respectivement.

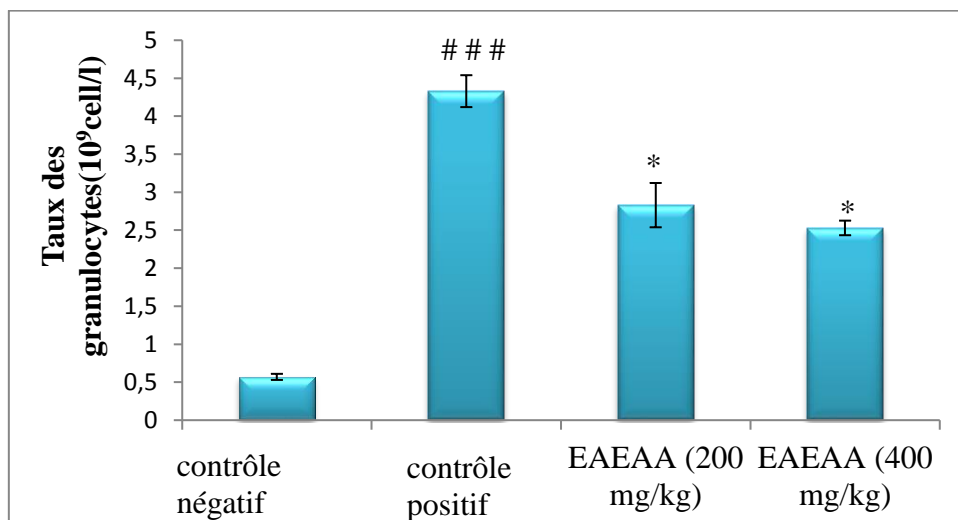


Figure 17: Taux de granulocytes chez les différents groupes traités.

Les résultats obtenus à l'issue des tests anti-inflammatoires montrent que l'extrait aqueux de EAEAA réduit de façon appréciable l'œdème induit par le formol. Dans les conditions expérimentales, le formol a provoqué l'œdème dont le volume est maximal au bout de trois heures.

Les plantes médicinales, ou plus exactement les métabolites secondaires bioactifs dérivés des plantes médicinales, comme elles possèdent un effet pharmacologique, peuvent aussi avoir un effet toxique.

On constate, d'après les résultats obtenus, que le lot traité par la dose 200 mg/kg n'a montré aucun signe de toxicité. En revanche, des tremblements ont été notés chez les souris des lots traités par la concentration 400 mg/kg de d'extrait, les souris ont montré aussi des signes de faiblesse associés à l'isolement individuel: somnolence, leurs mouvements diminuent.

D'après les travaux antérieurs d'**Otmani et Yahiaoui (2016)**, ces effets pourraient être dus à la présence des alcaloïdes qui sont toxiques à forte dose telles que selon **Zeggwagh et al (2013)** la protopine et la cryptopine. Des études sur les effets indésirables de la phytothérapie montrent que la plupart des effets nocifs des plantes médicinales sont rapportés à un non-respect de la dose adéquate.

L'inflammation aiguë, induite chez la souris par l'injection du formol, est un modèle standard et pratique, largement utilisé pour l'évaluation des propriétés anti-inflammatoires de différents agents (**Jilroy et al., 1999**).

Le mécanisme cellulaire et moléculaire par lequel le formol induit le processus inflammatoire est connu. Il stimule la libération de l'histamine et de la sérotonine par les mastocytes, débutant par cela une cascade d'évènements qui produisent d'autres médiateurs qui contribuent à l'établissement de la réaction inflammatoire aiguë (**Cuzzocrea et al. 1998**). En effet, le formol induit au cours de la phase précoce (1-2h) de la réaction inflammatoire, la production de facteurs pro-inflammatoires tels que l'histamine, la sérotonine, les leucotriènes, le PAF et les prostanoïdes. Ces facteurs provoquent des modifications vasculaires qui conduisent à l'exsudation plasmatique. Durant la phase tardive de ce processus inflammatoire (4-12h), ces facteurs chimioattractants induisent le recrutement des neutrophiles par chimiotactisme envers le site inflammatoire où ils libèrent leur arsenal cytotoxique et d'autres médiateurs

inflammatoires (**Dawson et al., 1991 ; Cuzzocrea et al., 2000a, b**). Deux populations de cellules inflammatoires interviennent au cours de l'inflammation induite par le formol. Les neutrophiles prédominent durant les 12 premières heures. Ils sont ensuite remplacés par les monocytes qui se différencient en macrophages tissulaires. Ces mononucléaires dominent alors la réaction inflammatoire jusqu'à sa résolution après 48 heures (**Jilroy et al., 1999**).

Les flavonoïdes inhibent la migration des leucocytes en bloquant leur adhésion à la paroi vasculaire (**Manthey, 2000 ; Middleton et al., 2000**). Cet effet serait dû à l'inhibition de la synthèse de l'IL-1 et le TNF- α , principaux inducteurs de l'expression des molécules adhésives sur la paroi vasculaire (**Cho et al., 2000**). Il a été rapporté en effet, que la quercétine bloque l'adhésion des leucocytes à la paroi endothéliale des veines ombilicale par l'inhibition de l'expression des ICAM-1 (**Anné et al., 1994**).

Prenant ces données ensemble, les extraits aqueux d'*Ephedra alata alenda* exerceraient leurs effets anti-inflammatoires par la réduction de la production des médiateurs inflammatoires impliqués dans le déroulement des étapes de la réaction inflammatoire aiguë induite par le formol, ainsi que par l'inhibition du recrutement des leucocytes vers le site d'inflammation en exerçant des effets anti-chimio attractants sur ces derniers.

Conclusion et perspectives

La connaissance et l'usage des plantes médicinales constituent un vrai patrimoine de l'être humain. Leur importance dans le domaine de la santé publique est très accentuée dans ces dernières années grâce aux thérapeutiques qu'elles procurent. Cette diversité en propriétés biologiques est liée certainement aux vertus thérapeutiques attribuées à une gamme extraordinaire de molécules bioactives synthétisées par la plante, non seulement contre des agents biologiques tels que les bactéries, les virus, mais aussi contre des agents chimiques tels que les oxydants et pro-inflammatoires. Les molécules naturelles de nature phénolique sont très recherchées en phytothérapie vu les effets secondaires des médicaments et les séquelles néfastes des antioxydants de synthèse à savoir le BHA et le BHT.

L'objectif primordial assigné par cette étude s'inscrit dans ce même contexte. Nous sommes intéressés à évaluer l'activité anti-microbienne, anti-oxydante et anti-inflammatoire de l'extrait aqueux d'*Ephedra alata alenda*.

Les profils de l'activité anti radicalaire révèlent que l'extrait testé possède une activité dose-dépendante. L'extrait aqueux d'*Ephedra alata alenda* a montré un pouvoir antioxydant important par comparaison avec la vitamine C.

La méthode de diffusion sur disques en milieu gélosé a montré que l'extrait de l'*Ephedra alata alenda* est pourvu d'effet inhibiteur plus ou moins important sur les souches testées.

L'activité anti-inflammatoire *in vivo* a été examinée pour l'extrait aqueux de la plante par un modèle animal: une inflammation aiguë provoquée par le formol chez les souris. La dose de 400 mg/kg a révélé un effet inhibiteur de l'extrait aqueux administré par voie intra-péritonéale dès la première heure qui suit l'injection du formol avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 52.31 %. Une diminution significative ($p < 0.05$) du nombre des leucocytes et des granulocytes a été observée chez les souris traitées en comparaison avec le groupe témoin positif.

Les résultats de cette étude nécessitent d'être approfondis par un ensemble de travaux en perspectives :

- Etude phytochimique avancée;
- fractionnement des extraits et identification des molécules responsables des différentes activités biologiques en utilisant des techniques d'identification plus performantes;

- évaluation d'autres activités biologiques tels que l'effet anticancéreux par d'autres méthodes comme la méthode de cytotoxicité;
- étude du mode d'action des substances ou fractions isolées;
- évaluation de la toxicité éventuelle de la plante en vue d'une utilisation sûre;
- par ailleurs le nombre d'animaux (souris), de souches microbiennes et autres doit être suffisamment élevé pour une meilleure fiabilité des résultats.

Références bibliographiques

- Abourashed, E.A., El-Alfy, A.T., Khan, I.A. et Walker, L. (2003).** Ephedra in perspective—a current review. *Phytother. Res*; **17**: pp. 703-712.
- Adedapo, A.A., Jimoh F.O., Koduru S., Masika P.J. et Afolayan A.J. (2009).** Assessment of the medicinal potentials of the methanol extracts of the leaves and stems of *Buddleja saligna*. *BMC Complement Altern. Med* ; **9**: 21p.
- Al-Qarawi, A.A., Abd Allah, E.F. et Hashem, A. (2012).** Effect of *Ephedra alata* on nucleic acids and nitrogen metabolism of seedborne *Aspergillus flavus* . *Pak. J. Bot* ; **44**(1) : pp. 425-428.
- AL-Qarawi, A.A., Abd_Allah, E.F. et Abeer, H. (2011).** *Ephedra alata* as biologically-based strategy inhibit aflatoxigenic seedborne mold. *African Journal of Microbiology Research*; **5** (16): pp. 2297-2303.
- Anné, S., Agarwal, M., Nair, M.P., Schwartz, S.A., Ballow, M., Kandaswami, C., Middleton, E.Jr. (1994).** Inhibition of endotoxin-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 and leukocyte adhesion to endothelial cells by plants flavonoids quercetin. *J Allergy Clin. Immunol* ; **93**: p 276
- Baghiani, A., Ameni, D., Boumerfeg, S., Adjadj, M., Djarmouni, M., Charef, N.(2012).** Studies of antioxidant and Xanthine oxidase inhibition potential of root and aerial parts of medicinal plants *Capparis spinosa* L. *Am J Med Sci*; **2**: 25-32.
- Beddou, F. (2015).** Etude phytochimique et activités biologiques de deux plantes médicinales sahariennes *Rumex vesicarius* L. et *Anvillea radiata* Coss. & Dur. Thèse de doctorat en Sciences. Université de Tlemcen. p164.
- Berger, M.M. (2006).** Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme* ; **20** : 48-53.
- Billing, J., Sherman, P.W. (1998).** Antimicrobial Functions of Spices;Why Some Like it Hot. *Quarterly Rev. Biol*; **73** (1): 3-49.

Bloor, S. J., (2001). Overview of methods for analysis and identification of flavonoids. *Method. Enzymol* ; **335**: 3-14.

Boozer, C.N., Nasser, JA., Heymsfield, S.B., Wang, V., Chen, G. et Solomon, J.L. (2001).
An herbal supplement containing Ma Huang-Guarana for weight loss: a randomized, doubleblind trial. *Int J Obes Relat Metab Disord*; **25**(3): pp. 316-324.

Botting, R.M. et Botting, J.H. (2000). Pathogenesis and mechanism of inflammation and pain: An overview. *Clinical Drug Investigation* ; **19**: 1-7.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1997). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*; **28**: 25-30.

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

Bussmanna, R.W., Malca-Garcia, G., Glenna, A., Sharona, D., Chaitc, G., Diaz, D., Pourmandd, K., Jonatd, B., Somogye, S., Guardadof, G., Aguirref, C., Chanf, R., Meyera, K., Kuhlmana, A., Townesmitha, A., Effio-Carbajalb, J., Frias-Fernandezb, F. et Benitob M.(2010). Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. *Journal of Ethnopharmacology*; **132**: pp. 101–10

Carattoli, A. (2009). Resistance Plasmid Families in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial agents and chemotherapy*; **53**(6): p. 2227–2238.

Caveny, S., Charlet, D.A., Freitqg, H., Maier-Stolete, M. et Starratt, A. N. (2001). New observations on the secondary chemistry of world Ephedra (Ephedraceae). *American Journal of Botany*; **88** (7):pp. 1199–1208.

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

Chen, W.L, Tsai, T.H., Yang, C.C.H., Kuo, T.B.J. (2010). Effects of ephedra on autonomic nervous modulation in healthy young adults. *Journal of ethnopharmacology*; **130**: pp. 563–568.

Cho, K.j., Yun, C.H., Yoon, D.Y., Cho, Y.S., Rimbach, G., Packer, L., Chung, A.S. (2000). Effect of bioflavonoids extracts from the bark of *Pinus maritime* on proinflammatory

cytokine interleukin-1 production in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*; **168**: 64-71.

Cuzzocrea, S., Mazzon, E., Calabro, G., Dugo, L., De Sabro, A., Van De Loo, F., Caputi, A.P. (2000a). Inducible nitric oxide synthase-knockout mice exhibit resistance to pleurisy and lung injury caused by carrageenan. *AmRespirCrit Care Med*; **162**: p 1859-1866.

Cuzzocrea, S., Santagati, S., Sautebin, L., Mazzon, E., Calabro, G., Serraino, I., Caputi, A.P., Maggi, A. (2000b). 17 β -Estradiol anti-inflammatory activity in carrageenan-induced pleurisy. *Endocrinol*; **141**(4): p 1455-1463.

Cuzzocrea, S., Zingarelli, B., Hake, P., Salzman, A., Szabo, C. (1998). Anti-inflammatory effects of mercaptoethylguanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger, in carrageenan-induced models of inflammation. *Free RadicBiol Med*; **24**(3): p 450-459.

Dacosta, E. (2003). Les phytonutriments bioactifs. *Yves Dacosta (éd)*. Paris, 317p.

Dawson, J., Sedgwick, A.D., Edwards, J.C.W., Lees, P. (1991). A comparative study of the cellular, exudative and histological responses to carrageenan, dextran and zymosan in the mouse. *Int J Tissue React*; **13**(4): 171-185.

Densiov, E.T., Afanas'ev, I.B. (2005). Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology. Eds: Taylor & Francis Group (U.S.A). 703-861.

Derbel, S., Touzard, B., Triki, M.A. et Chaieb, M. (2010). Seed germination responses of the Saharan plant species *Ephedra alata* ssp. *alenda* to fungicide seed treatments in the laboratory and the field. *Flora*; **205**: pp. 471–474.

Descamps-Latscha, B. et Witko-Sarsat, V. (1996). Cytokines pro-inflammatoires et cellules phagocytaires. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique* ; **36** : 310-314.

Di Carlo, G., MascoJo, N., Izzo, A.A., Capasso, F. (1999). Flavonoids: olei and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci* ; **65** : 337-353.

- Dombrowicz, D. et Capron, M. (2001).** Eosinophils, allergy and parasites. *Current Opinion in Immunology*; **13**: 716-720.
- Droge, W. (2002).** Free radicals in the physiological control of cell function. *Reviews of physiology* ; **82**: 47-95.
- Dzidic, S., Suskovic, J. et Kos, B.(2008).** Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. *Food Technol. Biotechnol*;**46** (1): 11–21.
- Eming , S.A., Krieg T. et Davidson J.M. (2007).** Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology* ; **127**: 514-525.
- Evans W.C., (2009).** Trease and Evans' Pharmacognosy. Saunders (16eme Ed).
- Fauve, R.M. et Hevin, M. (1998).** Réaction inflammatoire et réactions immunitaires. In: inflammation. Russo-Marie F., Peltier A., Polla B S. Eds, John Libbey Eurotext (France). 10-19.
- Favier, A. (2003).** Le stress oxidant : Intérêt conceptuel et experimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. Mécanismes biochimiques. 108-115.
- Fleuriet, A. (1982).** Expression et régulation du métabolisme des derives hydroxycinnamiques au cours de la croissance Thèse Doc. Etat, Montpellier.
- Fukai, K., Ishigami T. et Hara Y. (1991).** Antibacterial activity of tea polyphenols against hytopathogenic bacteria. *Agric. Biol. Chem*; **55**: 1895-1897.
- Ghasemi, F.M., Azarnia, M., Jamali, M., Mirabolghasemi, G., Nazarian, S., Naghizadeh, M. M., Rajabi, M., Tahamtani, Y. (2014).** Protective effects of *Ephedra pachyclada* extract on mouse models of carbon tetrachloride- induced chronic and acute liver failure. *Tissue and Cell* ; **46** : pp. 78– 85.
- Ghourri, M., Zidane, L., Douira, A. (2013).** Usage des plantes médicinales dans le traitement du Diabète Au Sahara marocain (Tan-Tan). *Journal of Animal &Plant Sciences* ;**17** : pp. 2388-2411
- Girotti-channu, C. (2006).** Etude de la lipolyse et de synthèse des composés du Derme sous l'effet de la Cirsimarine ,Flavone extraite de Microtea Debilis. Thèse de Doctorat .Institut national des sciences appliquées de Lyon.127.
- Goudable, J., Favier, A. (1997).** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutr .Clin. Métabol* ; **11**: 115-120.

- Gupta, R.S. (2011).** Origin of diderm (Gram-negative) bacteria: antibiotic selection pressure rather than endosymbiosis likely led to the evolution of bacterial cells with two membranes. *Antonie Van Leeuwenhoek* ; **100** : pp. 171–182.
- Harborne, J.B. (1980).** Plant phenolics. In: BELL EA, CHARLWOOD BV (eds) *Encyclopedia of Plant Physiology*, volume 8 *Secondary Plant Products*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York. 329-395.
- Hegazi, G.A.E. et El-Lamey, T.M. (2011).** In vitro Production of Some Phenolic Compounds from *Ephedra alata* Decne. *J. Appl. Environ. Biol. Sci*; **1** (8): pp.158-163.
- Herman, L. et Dewulf J. (2011).** Les animaux et la production animale comme source de l'antibiorésistance pour les humains. Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire, p. 04.
- Hikino, H., Konno C., Takata, H., Tamada, M. (1980).** Antiinflammatory Principle of *Ephedra* Herbs. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*; **28**(10): pp. 2900-2904.
- Hikino, H., Takahashi, M., et Konno, C. (1982).** Structure of ephedrannin a, a hypotensive principle of *Ephedra* roots. *Tetrahedron Letters*; **23**(6): pp. 673-676.
- Hogan, S.P., Rosenberg, H.F., Moqbel, R., Phipps, S., Foster, P.S., Lacy, P. et Kay, A.B. (2008).** Rothenberg ME (2008). Eosinophils: Biological Properties and Role in Health and Disease. *Clinical and Experimental Allergy* ; **38**: 709-750.
- Hong Wang, Q., Yang, Y .,Zhao, X., Zhu, B., Nan, P., Zhao, J., Wang, L.,Chen, F .,Liu, Z. et Zhong, Y. (2006).** Chemical variation in the essential oil of *Ephedra sinica* from Northeastern china .*Food Chemistry*; **98**: pp. 52-58
- Huang J. et Price R.A., (2003).** Estimation of the Age of Extant *Ephedra* Using Chloroplast *rbcL* Sequence Data. *Mol. Biol. Evol*; **20** (3): pp 435–440.
- Jilroy, D., Colvillr-Nash, P.R., Willis, D., Chivers, J., Paul-Clark, M.J., Willoughby, D.A. (1999).** Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med*; **5**(6): p 698-701

- Kessal, A. et Bouafia, O. (2003).** Phytoscreening and antibactériel of the plants *Ephedra alata*, *Launaea residifolia* and *Oudneya africana*. Diplôme d'ingénieur d'Etat. Université Kasdi Merbah-Ouargla. Mem. p. 66.
- Konno, C., Mizuno, T., Hikino H. (1985).** Isolation and hypoglycemic activity of ephedrans A, B, C, D and E, glycans of *Ephedra distachya* Herbs. *Planta medica*; **51**(2): pp. 162- 163.
- Kumar, V., Cotran, R.S. et Robbins, S.L. (2003).** *Robbins Basic Pathology*. Saunders.
- Landolfi R., Mower R.L., Steiner M. (1984).** *Biochem Pharmacol* ; **33** : 1525-1530.
- Lehucher-Michel, M.P., Lesgards, J.F., Delubac, O., Stocker, P., Durand, P., Prost, M. (2001).** Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale* ; **30**: 1076-1081.
- Limasset B., Doucen C., Dore J. Ch., Ojasoo T., Damon M., de Paulet A. C. (1993).** *Biochem. Pharmacol* ; **46** : 1257-1271.
- Limberger R.P., Jacques ALB, Schmitt GC. et Arbo MD., (2013).** Pharmacological Effects of Ephedrine. *Natural Products*, pp. 1218- 1237.
- Ling, M., Piddlesden, S. J. et Morgan, B. P. (1995).** A component of the medicinal herb ephedra blocks activation in the classical and alternative pathways of complement. *Clinical & Experimental Immunology*; **102**(3): p. 582–588.
- Lowy, F. D. (2003).** Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *Science in Medicine*; **111**: PP.1265–1273.
- Ma, G., Bavadekar, S.A., Davis, Y.M., Lalchandani, S.G. Nagmani, R., Schaneberg, B.T., Khan, I.A., et Feller, D.R. (2007).** Pharmacological Effects of Ephedrine Alkaloids on Human α_1 - and α_2 Adrenergic Receptor Subtypes. *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*; **322**(1): pp. 214- 221.
- Maillard, M. N. (1996).** Thèse Doct., E.N.S.IA., Paris, 148p
- Majno, G. et Joris, I. (2004).** Cellules, tissus et maladies. Oxford Univ. Press.
- Male, D., Roitt Y., Brostoff J. et Roth D.B. (2007).** Mécanisme de l'immunité innée. In: *Immunologie*. Eds, Masson (France), 155p.

- Manthey, J.M. (2000).** Biological properties of flavonoids pertaining to inflammation. *Microcirc*; **7**: p 28-34.
- Martinez-Cayuela, M. (1995).** Oxygen free radicals and human disease (A review). *Biochimie* ;**77**: 147-161.
- Middleton, E.J.R., Kandaswami, C., Heoradies, T.C. (2000).** The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacol Rev*; **52**: p 673-751.
- Milane, H. (2004).** La quercétine et ses derives : molécules à caractère peroxydant ou thérapeutiques. Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur Strasbourg I. 155p.
- Mohamed Soltan, M. et Kamal Zaki, A. (2009).** Antiviral screening of forty-two Egyptian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*; **126**: pp. 102–107.
- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Dominguez, J. M., Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez M.J. et Parajo, J. C. (2001).** Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*; **72**: pp, 145-171.
- Nawwar, M.A.M., El-Sissi, H.I., Barakat, H.H. (1984).** Flavonoid constituents of Ephedra alata. *Phytochemistry*; **23**(12): pp. 2937-2939.
- Neuzil, J. et Stocker, R. (1993).** Bilirubin attenuates radical mediated damage to serum albumin. *FEBS let*; **311** (3): 281-284.
- Nikaido, H. (1994).** Prevention of Drug Access to Bacterial Targets: Permeability Barriers and Active Efflux. *Science*; **264**: pp. 382-388.
- Nohl, H., Hegner, D. (1978).** Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo? *Eur. J. Biochem* ; **82**: 563-567
- Ossipov, M. H., Kovelowski, C. J., Porreca, F. (1995).** The increase in morphine antinoceptive potency produced by carrageenan-induced hindpaw inflammation is blocked by nalttrindole, a selective delta-opioid antagonist. *Neuroscience Letter*; **184**: 173-176.

- Otmani, A et Yahiaoui, S. (2016).** Etude de la Toxicité Aigüe et Subaigüe des Alcaloïdes de *Fumaria officinalis* sur des souris albinos Wistar. Mémoire de master. Université abdrrahmane Mira de Béjaïa.
- Ould El Hadj, M.D., Hadj-Mahammed, M. et Zabeirou, H. (2003).** place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région de Ouargla (sahara septentrional est). *Courrier du savoir* ; (3) : pp. 47-51.
- Ozenda, P. (1991).** Flore et végétation du Sahara. Centre National De La Recherche Scientifique, Paris (3ème Ed.). 662
- Parke, A., Parke, D.V. (1995).** The pathogenesis of inflammatory disease: Surgical shock and multiple system organ failure. *Inflammopharmacology*; **3**: 149-168.
- Parsaeimehr, A., Sargsyan, E. et Javidnia, K. (2010).** A Comparative Study of the Antibacterial, Antifungal and Antioxidant Activity and Total Content of Phenolic Compounds of Cell Cultures and Wild Plants of Three Endemic Species of *Ephedra*. *Molecules*; **15**: 1668-1678.
- Patrice Magnard. (2014).** La réaction inflammatoire aiguë. Copyright 2000-2014 Maxicours RCS PARIS B432623429.
- Phinney, K.W., Ihara, T. et Sander, L.C. (2005).** Determination of ephedrine alkaloid stereoisomers in dietary supplements by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*; **1077**: pp. 90–97.
- Pincemail, J., Siquet, J., Chapelle, J.P. et al. (2000).** Evaluation des concentrations plasmatiques en antioxydants, anticorps contre les LDL oxydées et homocystéine dans un échantillon de la population liégeoise. *Ann. Biol. Clin* ; **58** :178-185.
- Popovici, C., Saykova, I. et Tylkowski, B. (2009).** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel* ; **4** : pp. 25-39
- Rankin, J.A. (2004).** Biological mediators of acute inflammation. *AACN Clinical Issues* ; **15**: 3-17.
- Ruslan, M. (2008).** Origin and physiological roles of inflammation *Nature*; **454**: 428-435.

Sahnoun, Z., Jamoussi, K. et Zeghal K.M. (1998). Radicaux libres et anti-oxydants : physiologie, pathologie humaine et aspects thérapeutiques (IIème partie) = Cellular systems implicated in production of free radicals and physiological functions of these radicals and free radicals in human pathology Rencontre Nationales de Pharmacologie 1998; **53**(4) : 355-389

Sanchez-Moreno, C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *International Journal of Foods Science and Technology*; **8** (3): pp. 121-137.

Soni, M.G., Carabin, I.G., Griffiths, J.C., et Burdock, G.A. (2004). Safety of ephedra: lessons learned. *Toxicology Letters*; **150**: 97–110.

Sorg, O. (2004). Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus Biologies* ; **327**: 649-662.

Steinhubl, S.R. (2007). Platelets as Mediators of Inflammation. *Hematology/Oncology Clinics of North America*; **21**:115-121.

Tamada, M., Endo, E., Hikino, H. et Eabuto C. (1979). structure of ephedradine a, a hypotensive principle of Ephedra roots. *Tetrahedron letters* ; (10) : 873-876.

Thannickal, V.J., Fanburg, B.L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol* ; **279**: L1005-L1028.

Treki, A.S., Merghem, R. et Dehimat, L. 2009. Etude phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne d'une Labiée: *Thymus hirtus*. *Sciences & Technologie*, **29**: 25-29.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Biocell*; **39**: 44-84.

Vaubourdolle, M. (2007). Infectiologie. 3^{ème} édition. Paris : Wolters Kluwer, p460

Weill, B., Batteux, F. et Dhainaut, J. (2003). Immunopathologie et réactions inflammatoires. Eds, De Boeck Université (Paris). 12-23.

Yusuf, Y., (2006). Catechins in foods, *Trends Food Science Technology* ;**17**: 64-71.

Zang, X., Shang, M., Xu, F., Liang, J., Wang, X., Mikage, M. et Cai, S. (2013). A-Type Proanthocyanidins from the Stems of *Ephedra sinica* (Ephedraceae) and Their Antimicrobial Activities. *Molecules*;**18** (5): pp. 5172-5189.

Zeggwagh, A.A., Lahlou. Y., Bousliman, Y. (2013). service de réanimation Médicale et de Toxicologie Clinique-Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat-Maroc.

Zelko, I.N., Mariani, T.J. Folz, R.J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic. Biol. Med* ; **33**: 337-349.