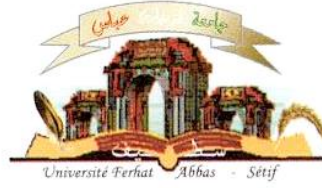


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALE

N°...../SNV/2021

THESE

Présenté par

HAMOUDI Meriem

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT 3ÈME CYCLE

Spécialité: PHYSIOLOGIE ANIMALE

THÈME

**Etude biologique, phytochimique et toxicologique des extraits de
la plante *Ephedra nebrodensis* de la région des Aurès.**

Soutenue publiquement le **05/04/2021**

DEVANT LE JURY

| | | |
|--------------|------------------------|---------------------------|
| Président | ARRAR Lekhmici | Pr UFA Sétif 1 |
| Directeur | DAHAMNA Saliha | Pr UFA Sétif 1 |
| Co-encadreur | KHENNOUF Seddik | Pr UFA Sétif 1 |
| Examineurs | LALAOUI Korichi | Pr UFM Constantine |
| | BOUAZIZ Amel | MCA UFA Sétif 1 |

Laboratoire de Phytothérapie Appliquée aux Maladies Chroniques (LPAMC)

2020/2021

Dédicace

En guise de reconnaissance envers mon ALLAH, Le Tout Puissant .Je dédie ce modeste travail à la communauté scientifique Espérant qu'il lui sera utile.

Je dédie ce travail,

À mes très chers parents,

Aucune dédicace, aucun mot ne pourrait exprimer à leur juste valeur la gratitude et l'amour que je vous porte.

Je mets entre vos mains, le fruit de longues années d'études, de longs mois de distance de votre amour de votre tendresse, de longs jours d'apprentissage.

Quand j'étais loin de vous, votre soutien et votre encouragement m'ont toujours donné de la force pour persévérer et pour prospérer dans la vie.

Chaque ligne de cette thèse chaque mot et chaque lettre vous exprime la reconnaissance, le respect, l'estime et le merci d'être mes parents.

A la pensée de mes grands-parents qu'ils restent à jamais gravés dans mon Cœur et mon esprit ! Que Dieu les accueille dans son vaste paradis, que Dieu aient son âme.

A mes sœurs et mon frère,

Imen, Ikram, Amel et Ahmed

À ma nièce et mes neveux,

Louli, Djamel et Mohamed

A toute la famille

Hamoudi et Chaouch.

Spécialement à tous mes amies

ZAHRA, NIHAD, AMINA, NARIMANE, ASMA et NADIA..... je vous souhaite tous un avenir plein de succès.

A tous ceux que j'aime.

Meriem

Remerciement

Avant toute chose, je remercie ALLAH, Le Tout Puissant, pour m'avoir donné le courage et la patience d'achever ce travail.

J'exprime ma profonde gratitude à madame Pr **Dahamna Saliha** ainsi que Monsieur Pr. **Khennouf Seddik**, Université Ferhat Abbas Sétif 1, qui m'ont fait l'honneur d'avoir veillé et dirigé ce travail. Leurs conseils pertinents, leurs compétences scientifiques et leurs compréhensions m'ont permis de mener à terme ce travail. Qu'ils trouvent ici mes sentiments de gratitude et l'expression de ma vive reconnaissance.

Je tiens particulièrement à remercier les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail et en être les examinateurs de cette thèse :

Monsieur Pr. **Arrar Lekhmici**, Université Ferhat Abbas Sétif 1, d'avoir accepté de juger ce travail et de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse. Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect.

Monsieur Pr. **Lalaoui Korichi**, Université Frères Mentouri, Constantine 1 et madame Dr. **Bouaziz Amel**, Université Ferhat Abbas Sétif 1, d'avoir accepté de juger ce travail et de participer aux jurys de cette thèse. Soyez assurée de ma profonde gratitude.

Je voudrais également adresser mes remerciements à toute l'équipe du laboratoire d'Anatomie Pathologique et spécialement Pr. Abdellouche, Dr. Kouala Smira et Mme Safia guessaf de m'avoir aidé pour la réalisation et l'interprétation des coupes histologiques ainsi que les membres de l'équipe du laboratoire central, spécialement Dr Djabi Farida et Mlle Hadjira Messad au Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) de Sétif, et l'équipe du laboratoire de Biochimie dans l'établissement hospitalier spécialisé CAC de Sétif qui m'ont permis d'effectuer les dosages des différents paramètres hématologiques et biochimiques.

Je voudrais également adresser mes remerciements au Pr Sylvie Michel et Dr Boutefnouchet Sabrina de m'avoir accueilli dans leurs laboratoire (CiTCoM UMR

8038 CNRS, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Équipe Produits Naturels, Analyses et Synthèses (PNAS), Université Paris Descartes, Paris, France) et m'ont permis d'effectuer les analyses phytochimiques et ainsi qu'à toute l'équipe du laboratoire.

Je tiens à remercier l'équipe de laboratoire de biochimie dans le centre de recherche en Biotechnologie (CRbt) à Constantine pour son accueil et spécialement Dr Bensuici Chawki pour son aide et ses conseils pour réaliser des tests biologiques *in vitro*.

Enfin, je n'oublie pas de remercier vivement les membres de notre équipe laborantine, en particulier, Amroun Djouher, Ghedjati Samira, Nouri Allaoua, Saoudi Soulef, Mayouf Nozha et qui ont partagé avec moi la vie quotidienne au sein du laboratoire.

Je remercie vivement tous les enseignants en particulier : Amira Smain (LPAMC), Daoud Harzallah (MA), Baghiani Abderrahmane (BA), Bouaziz Amel (LPAMC), Arrar Lekhmici (BA), Beghaiani abderahmane (BA), Gemaz Thoraya (BA), Katia abdelouahab (BA). Mouffouk Soumia (L.C.C.E, Université Batna 1) et Mouffouk Chaima (Fcaulté SNV, Department des Organismes, Université Batna 2).

Liste des travaux

Ce travail a fait l'objet des publications et communications suivantes :

Publications

Hamoudi M., Amroun D., Khenouf S., & Dahamna S. (2020). Antioxidant Evaluation and Polyphenol Contents of Hydro Ethanolic Extract's Fractions from *Ephedra nebrodensis*. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 10(5-s), 314-319. <https://doi.org/10.22270/jddt.v10i5-s.4377>

M Hamoudi., D Amroun., A Baghiani., S Khenouf., S Dahamna. (2021). *In vitro* Antioxidant, Anti-inflammatory (*in vitro* and *in vivo*) and analgesic activities of hydroalcoholic extracts of *Ephedra nebrodensis* from Eastern Algeria. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences* (in progress).

D Amroun., **M Hamoudi.**, S Khenouf., S Boutefnouchet., D Harzallah., M Amrane., S Dahamna. (2020). *In-vivo* anti-inflammatory activity and safety assessment of the aqueous extract of Algerian *Erica arborea* L. (Ericaceae) aerial parts, *Journal of Ethnopharmacology* , 271, 113881. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.113881>

Hamoudi M., Amroun D., Boutefnouchet S., Bensouici C., Kaoula S., Harzallah D., Khenouf S., Dahamna S. (2021). Phytochemical screening, *in vitro* antioxidant and enzyme inhibitory properties and acute toxicity of extracts from the aerial parts of *Ephedra nebrodensis*, source of bioactive compounds. *Comb Chem High Throughput Screen* (Abstract en ligne). <https://doi.org/10.2174/1386207324666210303094339>

Communications

- ✓ **HAMOUDI M**, Dahamna S, Amroun D, Khenouf S, Amira S, 2017. Evaluation of the antioxidant capacity of *Ephedra nebrodensis*. Journées Internationales de Biotechnologie (JIB/IDB 2017) de l'Association Tunisienne de Biotechnologie (A.T.Biotech). 18-22 Décembre, Yasmine EL Hammamet, Tunisie.
- ✓ **HAMOUDI M**, Dahamna S, Amroun D, 2018. Potentiel antioxydant d'une plante médicinale d'origine Algérienne. VI^{ème} Congrès International de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Resouces de l'Association Tunisienne de Biotechnologie (AT-BVR), 20-23 Mars. Tabarka, Tunisie.

- ✓ **HAMOUDI M**, Amroun D, Khenouf S, Bensouici C, Dahamna S, 2018. Recolte, identification et activite biologique d'*Ephedra major*. Premier Colloque International sur la Lutte Biologique et Intégrée en Algérie (CILBIA). Université Ben Boulaid- Batna 2, 04-06 Janvier. Batna, Algérie.
- ✓ **HAMOUDI M**, Amroun D, Khenouf S, Dahamna S, 2019. Effet d'Ephedra sur les paramètres hématologiques et biochimiques chez les rats femelles wistar. **VII^{eme} Congrès International de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Resouces** de l'Association Tunisienne de **Biotechnologie** (AT-BVR), 20-23 Mars. Tabarka, Tunisie.
- ✓ **HAMOUDI M**, Amroun D, Khenouf S, Dahamna S, 2019. Effet aigus de la décoctée d'*Ephedra nebrodensis* sur les paramètres de croissance et les paramètres histologiques chez les souris *Swiss*. **International Symposium on Toxicology, Food and Environmental Health (ISTFEH)**. Institute Supérieur des Sciences appliqués et de Technologie de Mahdia (ISSAT), 26-27 Avril. Mahdia, Tunisie).
- ✓ **HAMOUDI M**, Amroun D, Khenouf S, Dahamna S, 2019. Effet chronique d'Ephedra sur les paramètres biochimiques et hématologiques chez les rats mâles *wistar*. **Algerian American Foundation Summer University. (AAF 2019)**. Université Moustefa Ben Boulaid- Batna 2, 28-03 août. Batna, Algeria.
- ✓ **HAMOUDI M**, Dahamna S, 2020. Eude toxicologique de l'extrait aqueux brute d'*Ephedra nebrodensis* sur les organes, les paramètres hématologiques et biochimiques chez les rats mâles *wistar*. **Third International Symposium: Medicinal Plants and Materials (MPM-2020)**. Université de Larbi Tebessi, 25-27 February. Tebessa, Algeria.
- ✓ **HAMOUDI M**, Amroun D, Bensouici C, Khenouf S, Dahamna S, 2020. Activité anticholinestérase *in vitro* d'*Ephedra nebrodensis* contre AchE et BchE. **Journés Scientifiques Nationales sur les Enzymes à Application Biotechnologiques en Algérie (JSNEABA'20)** Ecole Nationale Supérieur de Biotechnologie-Taoufik Khaznadar, 21-22 Décembre. Constantine, Algérie.

ملخص

الهدف من هذا البحث هو تقييم الخصائص المضادات للأوكسدة باستعمال اختبار DPPH ، ABTS ، CUPRAC ، FRAP، استخلاص الحديد و-β كاروتين / حمض اللينولييك) ، وكذلك المضادة للكولينسترز ، المضادة للإلتهاب و التأثير المسكن للألم للمستخلصات الهيدرو كحولية و المستخلص المائي (EtOAc، EtAce، MeOH، EtOH) و أجزاء من *Ephedra nebrodensis* كما تم تقييم سمية المستخلص (AQ). ننوه أنه لأول مرة تمت دراسة السمية والنشاطات البيولوجية للمستخلص (AQ). أظهرت نتائج التحليل الكمي الفيتوكيميائي (تحديد المركبات الفينولية (CP) ، الفلافونويدات الكلية (FT) الدباغ الكلية (TT) أن المستخلص و الجزء أسيتات الإيثيلي (EtOAc) هو الأغنى بـ (CP) و (FT) بمحتويات تقدر بـ 1.50 ± 238.45 و 0.031 ± 269.669 ميكروغرام موافق للحمض الغاليك / ملغ من المستخلص و 0.00 ± 21.13 و 0.003 ± 44.507 ميكروغرام موافق للكركستين / ملغ من المستخلص، على التوالي. من ناحية أخرى، تنسب أعلى المستويات في الدباغ إلى المستخلص MeOH و الجزء EtOAc بمحتوى قدر بـ 1.57 ± 89.07 و 1.362 ± 228.487 ميكروغرام موافق للحمض التانيك / ملغ من المستخلص. تحليل GC-MS للمستخلصات السيليلية يسمح بتحديد القلويات (الايفيدرين ، البسودوايفيدرين والنورايفيدرين) ، الفلافونول (الكاتيشين والايبيغالوكاتشين) وحمض البروتوكاتشيك. حدد تحليل HPLC-MS للمستخلصات EtOAc، EtOH، MeOH، EtAce و 22 مركبًا فينوليًا ، بما في ذلك خمسة فلافون جليكوسيدات وثلاثة فلافونول ريتنوزيدات وثلاثة فلافونول غليكوزيدات وثلاثة فلافونول رموزيدات وواحد فلافونول غليكورونيد وثلاثة احماض هيدروسيناميكية و حمضان فينوليان. أظهرت نتائج الأنشطة البيولوجية مخبريا أن مستخلصات AE و EtAce هي الأكثر نشاطاً في معظم الاختبارات المدروسة. تظهر نتائج النشاط الإنزيمي أن معظم المستخلصات تظهر تثبيطاً قويا يصل إلى 99% ضد بوتيريل كولينسترز (BchE) مقارنة بأسييتيل كولينسترز (AChE). تملك المستخلصات EtOH ، EtAce و MeOH أعلى تأثير مضاد للإلتهابات مخبريا مع نسبة تثبيط تتراوح من 56% إلى 82%. من ناحية أخرى ، فإن معالجة الفئران بالمستخلصات المدروسة (400 مغ / كغ) يثبط الالتهاب الناجم عن زيت الكروتون والألم الناجم عن حمض الأسيتيك بنسب تثبيط بين (37.96% إلى 72.22%) و (50.29% إلى 74.26%) على التوالي. بالنسبة للسمية الحادة ، تسببت جرعات 2000 و 5000 ملغ / كغ من المستخلص (AQ) في حدوث تغيير في وزن جسم الحيوانات ولوحظ تلف طفيف في الكبد والكلى عند جرعة 5000 ملغ / كغ ، والجرعة المميتة (LD₅₀) كانت أكبر من 5000 ملغ / كغ. في السمية فوق الحادة، لم يلاحظ أي تغيير في مؤشرات الدم عند الإناث، ومن ناحية أخرى تم تسجيل انخفاض في GB بالنسبة لذكور الجرذان، وبعض التغيرات في توازن الدهون ومستوى ALAT عند ذكور الجرذان بجرعة 1200 مغ / كغ. أخيراً ، المعالجة بالمستخلص (AQ) بجرعات 300 ، 600 و 1200 ملغ / كغ / لمدة 90 يوماً يمكن أن تسبب تغييرات في بعض المؤشرات الدموية والبيوكيميائية بجرعة 1200 ملغ / كغ. في الختام، مستخلصات *E. nebrodensis* تظهر أنشطة بيولوجية مثيرة للاهتمام ، بالإضافة إلى أن المستخلص (AQ) ليس سام على المدى القصير والطويل بجرعات متكررة تصل إلى 600 ملغ / كغ.

الكلمات المفتاحية: *Ephedra nebrodensis* ، دراسة الكيمائية ، الأنشطة البيولوجية، السمية الحادة وفوق الحادة ، السمية المزمنة، مستخلصات.

Résumé

Le but de cette recherche est d'évaluer les propriétés antioxydantes en utilisant les tests : DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP, chélation de fer et β -carotène/acide linoléique, en plus de l'activité anticholinestérase, anti-inflammatoire et analgésique des extraits hydro-alcooliques et aqueux (EtOH, MeOH, EtAce, EtOAc et AQ) et les fractions d'*Ephedra nebrodensis*. La toxicité de l'extrait (AQ) a été également évaluée. Signalant que pour la première fois la toxicité et les activités biologiques de l'extrait (AQ) ont été étudiées. Les résultats de l'analyse phytochimique quantitatives (dosage des composés phénoliques (CP), flavonoïdes totaux (FT) et tanins totaux (TT) ont montré que l'extrait et la fraction d'acétate d'éthyle (AE) sont les plus riches en CP et en FT avec des teneurs de (238.45 ± 1.50 et $269.669 \pm 0.031 \mu\text{g EAG/mg}$ d'extrait) et ($21.13 \pm 0,00$ et $44.507 \pm 0.003 \mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait), respectivement, par contre les taux les plus élevés en tanins sont attribués à l'extrait MeOH et la fraction AE avec une teneur de 89.07 ± 1.57 et $228.487 \pm 1.362 \mu\text{g EAT/mg}$ d'extrait. L'analyse GC-MS des extraits silylés a permis l'identification des alcaloïdes (éphedrine, pseudo-éphedrine et nor-éphedrine), des flavonols (catéchine et epigallocatechine) et l'acide protocatéchique. L'analyse par HPLC-MS des extraits EtOH, MeOH, EtOAc, EtAce, et AQ a identifiée 22 composés phénoliques, dont cinq flavones glucoside, trois flavonols rutinoside, quatre flavonols glucoside, trois flavonols rhamnoside, un flavonol glucuronide, un flavone glucuronide, trois acides hydro-cinnamiques et deux acides phénoliques. Les résultats des activités biologiques *in vitro* ont montré que les extraits EtOAc et EtAce sont les plus actifs dans la plupart des tests étudiés. Les résultats de l'activité enzymatique révèlent que la plupart des extraits présentent une meilleure inhibition qui peut aller jusqu'à 99% contre la butyrylcholinestérase (BchE) que l'acetylcholinestérase (AchE). Les extraits EtOH, EtAce et MeOH possèdent l'effet anti-inflammatoire *in vitro* le plus élevé avec un pourcentage d'inhibition qui varie de 56% à 82%. Par contre le traitement des souris par les extraits (400 mg/kg) a inhibé l'inflammation induite par l'huile de coton et la douleur induite par l'acide acétique avec des pourcentages d'inhibition respectifs (37.96% à 72.22%) et (50.29% à 74.26%). Pour la toxicité aiguë, les doses de 2000 et 5000 mg/kg de l'extrait (AQ) ont provoquées un changement du poids corporel des animaux et des légères lésions du foie et du rein à la dose de 5000 mg/kg ont également été observées, donc la dose létale (DL_{50}) était supérieure à 5000 mg/kg. Dans la toxicité subaiguë, aucun changement dans les paramètres hématologiques n'a été observé chez les femelles, par contre une diminution des GB a été signalée chez les rats mâles, quelques changements dans le bilan lipidique et le taux d'ALAT chez les rats mâles à la dose de 1200 mg/kg. Enfin le traitement par l'extrait (AQ) à des doses de 300, 600 et 1200 mg/kg/jour pendant 90 jours pourrait provoquer des altérations de quelques paramètres hématologiques et biochimiques à la dose 1200 mg/kg. En conclusion, les extraits d'*E. nebrodensis* présentent des activités biologiques intéressantes. De plus l'extrait (AQ) n'est pas toxique (à court terme et à long terme) et à des doses répétées jusqu'à 600 mg/kg.

Mots clés : *Ephedra nebrodensis*, Etude phytochimique, Activités biologiques, Toxicité aiguë et subaiguë, Toxicité chronique, Extraits.

Abstract

The aim of this research is to evaluate the antioxidant activities using different tests (DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP, iron chelation and β -carotene/linoleic acid), anti-cholinesterase, anti-inflammatory and analgesic properties of hydroalcoholic and aqueous (EtOH, MeOH, EtAce, EA and AQ) extracts and fractions of *Ephedra nebrodensis*. The toxicity of the (AQ) extract was also evaluated. Signaling that for the first time the toxicity and biological activities of the (AQ) extract were studied.

The results of the quantitative phytochemical analysis (determination of phenolic compounds (PC), total flavonoids (TF) and total tannins (TT) showed that ethyl acetate (EA) extract and fraction are the richest in PC and FT with contents of 238.45 ± 1.50 μg EAG/mg of dry extract and 21.13 ± 0.00 μg EQ/mg of dry extract, respectively. Whereas the highest tannin levels are attributed to the MeOH extract and EA fraction with a content of 89.07 ± 1.57 and 228.487 ± 1.362 μg EAT/mg of dry extract.

GC-MS analysis of the silyle extracts enabled the identification of alkaloids (ephedrin, pseudo-ephedrin and nor-ephedrin), flavonols (catechin and epigallocatechin) and protocatechic acid. HPLC-MS analysis of EtOH, MeOH, EA, EtAce, and AQ extracts identified 22 phenolic compounds, including five flavone glucoside, three flavonol rutinoside, four flavonol glucoside, three flavonol rhamnoside, one flavonol glucuronide, one flavone glucuronide, three hydrocinnamic acid and two phenolic acids.

The results of *in vitro* biological activities have shown that EA and EtAce extracts are the most active in most of the tests studied. Enzyme activity results reveal that most extracts show better inhibition of up to 99% against butyrylcholinesterase (BchE) than acetylcholinesterase (AChE). EtOH, EtAce and MeOH extracts have the highest *in vitro* anti-inflammatory effect with an inhibition percentage that ranges from 56% to 82%. On the other hand, the treatment of mice with the extracts (400 mg/kg) inhibited the inflammation induced by cotton oil and the pain induced by acetic acid with respective inhibition percentages (37.96% to 72.22%) and (50.29% to 74.26%).

For acute toxicity, doses of 2000 and 5000 mg/kg of the (AQ) extract caused a change in the body weight of the animals and slight lesions of the liver and kidney at the dose of 5000 mg/kg were also observed, therefore the lethal dose (LD₅₀) was higher than 5000 mg/kg. In sub-acute toxicity, no changes in hematological parameters was observed in females, however, decreased in WBCs were reported in male rats, some changes in lipid balance and ALAT levels in male rats at 1200 mg/kg. Finally, treatment with the (AQ) extract at doses of 300, 600 and 1200 mg/kg/day for 90 days could cause alterations in some hematological and biochemical parameters at the 1200 mg/kg dose. In conclusion, *E. nebrodensis* extracts present interesting biological activities. Moreover, the (AQ) extract is non-toxic (short term and long term) at repeated doses up to 600 mg/kg.

Key words: *Ephedra nebrodensis*, Phytochemical study, Biological activities, Acute and subacute toxicity, Chronic toxicity, Extracts

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|-----------|
| Tableau 1: Alcaloïdes, flavonoïdes et acides phénoliques identifiés dans l'espèce <i>Ephedra nebrodensis</i> | 6 |
| Tableau 2: Classification d'une substance toxique basée sur une gamme de doses DL ₅₀ | 11 |
| Tableau 3: Certains facteurs de la toxicité des plantes médicinales. | 14 |
| Tableau 4: Paramètres biologiques de la fonction hépatique. | 17 |
| Tableau 5: Principales espèces réactives d'oxygène (ERO) | 24 |
| Tableau 6: Médiateurs inflammatoires. | 43 |
| Tableau 7: Plantes médicinales à effet analgésique..... | 49 |
| Tableau 8: Rendement, Teneur en composés phénoliques totaux (TCP), Teneur en flavonoïdes totaux (TF) et teneur en Tanins totaux (TT) des extraits d' <i>E. nebrodensis</i> | 72 |
| Tableau 9: Rendement des fractions, Teneur en composés phénoliques totaux (TCP), Teneur en flavonoïdes totaux (TFT) et teneur en Tanins totaux (TT) de différentes fractions obtenues à partir de l'extrait d'éthanol 70% de la partie aérienne d' <i>E. nebrodensis</i> | 74 |
| Tableau 10: Temps de rétention (TR), longueurs d'onde d'absorption maximale dans la région visible (λ_{\max}), valeur <i>m/z</i> des composés phénoliques identifiés dans l'extrait Methanol 85% d' <i>E. nebrodensis</i> | 77 |
| Tableau 11: Temps de rétention (TR), longueurs d'onde d'absorption maximale dans la région visible (λ_{\max}), valeur <i>m/z</i> des composés phénoliques identifiés dans l'extrait Ethanol:acetone d' <i>E. nebrodensis</i> | 78 |
| Tableau 12: Temps de rétention (TR), longueurs d'onde d'absorption maximale dans la région visible (λ_{\max}), valeur <i>m/z</i> des composés phénoliques identifiés dans l'extrait Ethanol 70% d' <i>E. nebrodensis</i> | 80 |
| Tableau 13: Temps de rétention (TR), longueurs d'onde d'absorption maximale dans la région visible (λ_{\max}), valeur <i>m/z</i> des composés phénoliques identifiés dans l'extrait acétate d'éthyle d' <i>E. nebrodensis</i> | 81 |
| Tableau 14: Temps de rétention (TR), longueurs d'onde d'absorption maximale dans la région visible (λ_{\max}), valeur <i>m/z</i> des composés phénoliques identifiés dans l'extrait (AQ) d' <i>E. nebrodensis</i> | 82 |
| Tableau 15: Composition chimique de l'extrait Methanol 85% d' <i>E. nebrodensis</i> déterminée par CPG-MS..... | 86 |
| Tableau 16: Composition chimique de l'extrait Ethanol 70% d' <i>E. nebrodensis</i> déterminée par CPG-MS..... | 87 |
| Tableau 17: Composition chimique de l'extrait Ethanol:acetone d' <i>E. nebrodensis</i> déterminée par CPG-MS..... | 88 |

| | |
|--|------------|
| Tableau 18: Composition chimique de l'extrait acétate d'éthyle d' <i>E. nebrodensis</i> déterminée par CPG-MS. | 89 |
| Tableau 19: Composition chimique de la l'extrait (AQ) d' <i>E. nebrodensis</i> déterminée par CPG-MS. . | 90 |
| Tableau 20: Poids corporels chez les rats femelles et mâles pendant 30 jours de traitement. | 96 |
| Tableau 21: Poids relatifs des organes chez les rats femelles et mâles après un traitement de 30 jours par l'extrait (AQ). | 98 |
| Tableau 22: Paramètres hématologiques chez rats mâles après un traitement de 30 jours. | 99 |
| Tableau 23: Paramètres biochimiques chez rats femelles et mâles après un traitement de 30 jours. . | 101 |
| Tableau 24: Poids corporels chez les rats femelles et mâles pendant 90 jours de traitement. | 106 |
| Tableau 25: Poids relatifs des organes chez les rats femelles et mâles après un traitement de 90 jours. | 108 |
| Tableau 26: Paramètres hématologiques chez rats femelles et mâles après un traitement de 90 jours. | 109 |
| Tableau 27: Paramètres biochimiques des chez rats femelles et mâles après un traitement de 90 jours. | 114 |
| Tableau 28: Tests de DPPH et ABTS de différentes fractions obtenues à partir de l'extrait d'éthanol 70% de la partie aérienne d' <i>E. nebrodensis</i> | 120 |
| Tableau 29: Activité antioxydante <i>in vitro</i> des extraits d' <i>E. nebrodensis</i> | 127 |
| Tableau 30: Activité anticholinestérase <i>in vitro</i> des extraits d' <i>e. nebrodensis</i> | 128 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|-----|
| Figure 1: (A) Le schéma montre un foie adulte. (B) Schéma de l'architecture cellulaire du foie..... | 15 |
| Figure 2: Coupe d'un rein. | 19 |
| Figure 3: Schéma d'un néphron avec le corpuscule de Malpighi et les différentes parties des tubules | 20 |
| Figure 4: Sources endogènes des ERO et ERN | 24 |
| Figure 5: Différentes structures des principaux antioxydants endogènes et exogènes | 31 |
| Figure 6: Structures chimiques des acides phénoliques naturels. | 36 |
| Figure 7: Structures chimiques des principales classes de flavonoïdes et de certains composés apparentés aux flavonoïdes..... | 38 |
| Figure 8: Champ d' <i>Ephedra nebrodensis</i> dans la montagne des Aurès (A), la plante dans la nature en mois de mai 2017 (B). | 53 |
| Figure 9: Partie aérienne entière (A), fleurs, fruits (B) et tiges (C) d' <i>E. nebrodensis</i> | 53 |
| Figure 10: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique | 54 |
| Figure 11: Courbe d'étalonnage de quercétine. | 55 |
| Figure 12: Courbe d'étalonnage de l'acide tannique | 55 |
| Figure 13: Réaction chimique impliquée dans le test spectrophotométrique DPPH. | 63 |
| Figure 14: Réaction chimique impliquée dans le test spectrophotométrique ABTS | 64 |
| Figure 15: Chromatogrammes HPLC des extraits Methanol 85 % (A), Ethanol 70% (B), Ethanol:acétone (C), Acétate d'éthyle (D) et aqueux (E) d' <i>E. nebrodensis</i> , enregistré à 356 nm..... | 76 |
| Figure 16: Chromatogrammes CPG-MS des composés dérivés dans les extraits Methanol 85 % (A), Ethanol 70% (B), Ethanol:acétone (C), Acétate d'éthyle (D) et aqueux (E) d' <i>E. nebrodensis</i> | 85 |
| Figure 17: L'évolution du poids corporel des souris mâles et femelles traités par les extraits d' <i>Ephedra nebrodensis</i> pendant la toxicité aiguë. | 93 |
| Figure 18: Coupes Histologiques de la toxicité aiguë de tissus des souris..... | 95 |
| Figure 19: Prise alimentaire et l'ingestion d'eau chez les rats femelles pendant 30 jrs de traitement.. | 97 |
| Figure 20: Prise alimentaire et l'ingestion d'eau chez les rats mâles pendant 30 jrs de traitement..... | 97 |
| Figure 21: Résultats histopathologiques des organes (foie, reins et cœur) chez les rats après administration orale de l'extrait (AQ) pendant 30 jours..... | 105 |
| Figure 22: Prise alimentaire et l'ingestion d'eau pour les rats femelles Traités avec l'extrait (AQ) pendant 90 jrs..... | 107 |
| Figure 23: Prise alimentaire et l'ingestion d'eau pour les rats mâles traités avec l'extrait (AQ) pendant 90 jrs..... | 107 |

| | |
|--|------------|
| Figure 24: Résultats histopathologiques des organes (foie, reins et cœur) chez les rats après l'administration orale de l'extrait (AQ) pendant 90 jours. | 116 |
| Figure 25: Activité scavenger vis à vis au DPPH et l'ABTS. | 118 |
| Figure 26: Test de blanchissement de β -carotène à 470 est représenté par des concentrations inhibitrices à 50% (CI ₅₀). | 121 |
| Figure 27: Cinétique du blanchiment du β -carotène en présence de FH, FC, FAE, FB, FA, eau, méthanol et BHT pendant 24h. | 122 |
| Figure 28: Test cuprac des extraits d' <i>E. nebrodensis</i> | 123 |
| Figure 29: Pouvoir réducteur des extraits d' <i>E. nebrodensis</i> | 124 |
| Figure 30: Une comparaison entre les différentes fractions dans le test de pouvoir réducteur. | 125 |
| Figure 31: Activité chélation de fer des extraits d' <i>E. nebrodensis</i> | 126 |
| Figure 32: Activité anti inflammatoire <i>in vitro</i> des extraits d' <i>E. nebrodensis</i> | 130 |
| Figure 33: Effet des extraits d' <i>E. nebrodensis</i> sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez les souris. | 131 |
| Figure 34: Pourcentage d'inhibition de la réponse nociceptive des extraits d' <i>E. nebrodensis</i> | 133 |

LISTE DES ABBREVIATIONS

- ABTS**^{•+} : 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
- AchE** : Acétylcholinestérase
- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- AINS**: Anti-inflammatoires non stéroïdiens.
- AIS**: Anti-inflammatoires stéroïdiens.
- ALAT**: Alaline aminotransférase
- AMPc** : Adénosine monophosphate cyclique
- AQ**: Extrait aqueux
- ARN** : Acide ribonucléique
- ASAT**: Aspartate aminotransférase
- ASP**: Aspérine
- AU** : Acide urique
- BchE** : Butyrylcholinestérase
- BHA**: Hydroxyanisole butylé
- BHT**: Hydroxytoluène butylé
- BSA**: Bovin serum albumin
- CAT**: Catalase
- CHOL**: Cholestérol
- CI₅₀**: Concentration inhibitrice à 50%
- CPG-MS**: Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse
- CREA**: Créatinine
- Cuprac**: Cupric Reducing Antioxidant Capacity
- DIC**: Diclofénac
- DL₅₀** : Dose létale 50
- DMPD**: N,N-diméthyl-p-phenylendiamine
- DPPH**[•]: 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
- EA**: Extrait ethyle acétate
- EtAce**: Extrait Ethanol : acétone
- EAG**: Equivalent acide gallique
- EAT**: Equivalent acide tannique
- EDTA**: L'acide éthylènediaminetétraacétique
- EtOH**: Extrait ethanolique 70%

EQ: Equivalent quercétine

ERO: Espèces réactifs d'oxygènes

FADH₂: Flavine adénine dinucléotide

FRAP: Ferric reducing acticity power

GB: Globules blancs

GGT: Gamma-glutamyl transpeptidases

GP_x: Glutathione peroxidase

GSH: Glutathione

HOB_r: Acide hypobromeux

HOCl: Acide hypochloreux

HPLC-DAD-MS: High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection with mass spectrometry

IASP: International Association for the Study of Pain

MeOH: Extrait méthanolique 85%

OCDE: Organisation de coopération et de développement économiques

PAL: Phosphatase alcaline

PLT: Plaquettes

SOD: Superoxide dismutase

TRIG: Triglycéride

Sommaire

| | |
|--------------------|---|
| Introduction | 1 |
|--------------------|---|

Revue Bibliographique

| | |
|--|-----------|
| I. Généralité sur <i>Ephedra nebrodensis</i> | 3 |
| I.1. Localisation et Description..... | 3 |
| I.2. Classification | 4 |
| I.3. Utilisation traditionnelle et propriétés pharmacologiques | 4 |
| I.4. Phytochimie de la plante | 6 |
| I.5. Recherches récentes sur <i>E. nebrodensis</i> | 7 |
| I.6. Propriétés pharmacologiques de l'éphedrine | 8 |
| II. Toxicité des plantes..... | 10 |
| II.1. Généralités sur la toxicité et effets toxiques | 10 |
| II.2. Tests de toxicité..... | 11 |
| II.2.1. Toxicité aiguë | 11 |
| II.2.2. Toxicité subaiguë | 12 |
| II.2.3. Toxicité chronique | 12 |
| II.3. Toxicité des plantes médicinales..... | 13 |
| II.3.1. Causes de toxicité des plantes..... | 13 |
| II.4. Hépto-toxicité | 13 |
| II.4.1. Physiologie et anatomie du foie | 13 |
| II.4.2. Principales lésions hépatiques | 15 |
| II.4.2.1. Stéatose | 16 |
| II.4.2.2. Nécrose | 16 |
| II.4.2.3. Cirrhose..... | 16 |
| II.4.3. Marqueurs biologiques de la fonction hépatique | 17 |
| II.5. Néphro-toxicité..... | 18 |

| | |
|---|-----------|
| II.5.1. Physiologie rénale | 18 |
| II.5.2. Structure rénale | 19 |
| II.5.3. Principales lésions rénales | 20 |
| II.5.4. Marqueurs biochimiques rénale | 21 |
| II.5.4.1. Dosages sanguins | 21 |
| II.5.4.2. Dosages urinaires | 22 |
| III. Stress oxydatif et antioxydant | 23 |
| III.1. Stress oxydatif | 23 |
| III.1.1. Définition | 23 |
| III.1.2. Espèces réactives de l'oxygène (ERO) | 23 |
| III.1.3. Sources des ERO | 24 |
| III.1.3.1. Sources endogènes des ERO | 24 |
| III.1.4. Causes | 26 |
| III.1.5. Rôles biologiques des ERO | 26 |
| III.1.6. Pathologies liées au stress oxydatif | 27 |
| III.2. Antioxydants | 31 |
| III.2.1. Définitions et classifications | 31 |
| III.2.2. Antioxydants enzymatiques | 32 |
| III.2.2.1. Superoxyde dismutase (SOD) | 32 |
| III.2.2.2. Catalase (CAT) | 33 |
| III.2.2.3. Glutathione peroxidase (GPx) | 33 |
| III.2.3. Antioxydants non enzymatiques | 33 |
| III.2.3.1. Glutathione (GSH) | 33 |
| III.2.3.2. Acide urique | 34 |
| III.2.3.3. Bilirubine | 34 |
| III.2.3.4. Coenzyme Q (ubiquinone) | 34 |
| III.2.3.5. Vitamines | 35 |

| | |
|--|-----------|
| III.2.3.6. Caroténoïdes | 35 |
| III.2.3.7. Antioxydants phénoliques (Polyphénols) | 36 |
| A. Acides phénoliques (acides hydroxybenzoïque et hydroxycinnamique)..... | 36 |
| B. Flavonoïdes | 37 |
| C. Tanins | 39 |
| D. Stilbénes | 39 |
| E. Lignanes | 40 |
| IV. Généralités sur l'inflammation et les anti-inflammatoires | 41 |
| IV.1 Types d'inflammation | 41 |
| IV.1.1. Inflammation aiguë..... | 41 |
| IV.1.2. Inflammation chronique | 42 |
| IV.2. Médiateurs inflammatoires | 43 |
| IV.3. Les anti-inflammatoires..... | 44 |
| IV.3.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)..... | 44 |
| IV.3.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) | 44 |
| IV.3.3. Anti-inflammatoires morphiniques..... | 45 |
| V. Généralités sur la douleur et les antalgiques | 48 |
| V.1. Rappel sur la douleur..... | 48 |
| V.2. Types de la douleur | 48 |
| V.3. Sources des analgésiques | 48 |
| V.3.1. Analgésiques non morphiniques..... | 49 |
| V.3.2. Analgésiques morphiniques (opioïdes) | 49 |
| V.3.3. Analgésiques naturels | 50 |

Matériels et Méthodes

| | |
|-----------------------------|-----------|
| I. Matériels..... | 53 |
| I.1. Matériel végétal | 53 |

| | |
|--|-----------|
| I.2. Animaux | 54 |
| I.3. Réactifs chimiques et équipements | 54 |
| II. Méthodes | 55 |
| II.1. Préparation des extraits végétaux | 55 |
| II.1.1. Préparation de l'extrait aqueux | 55 |
| II.1.2. Préparation des extraits hydro-alcooliques | 55 |
| II.1.3. Préparation des fractions a partir de l'extrait hydro-éthanolique | 55 |
| II.2. Analyse quantitative | 56 |
| II.2.1. Détermination des polyphénols totaux dans les extraits | 56 |
| II.2.2. Détermination des flavonoïdes totaux dans les extraits | 57 |
| II.2.3. Détermination des tannins totaux dans les extraits | 57 |
| II.3. Analyses qualitatives | 58 |
| II.3.1. Chromatographie sur couche mince CCM | 58 |
| II.3.2. Analyse HPLC-DAD-MS des extraits d' <i>Ephedra nebrodensis</i> | 59 |
| II.3.3. Identification des alcaloïdes par chromatographie en phase gazeuse couplée à la masse (CPG-MS)..... | 59 |
| II.3.3.1. Préparation des échantillons (silylation) | 59 |
| II.3.3.2. Méthode utilisée pour CPG-MS | 60 |
| II.4. Etude toxicologique de l'extrait aqueux | 60 |
| II.4.1. Toxicité aigus chez les souris | 60 |
| II.4.1.1. Observations | 61 |
| II.4.1.2. Poids corporel..... | 61 |
| II.4.1.3. Etude histologique | 61 |
| II.4.2. Toxicité subaigus de l'extrait aqueux | 62 |
| II.4.2.1. Prélèvement du sang et des organes | 62 |
| II.4.2.2. Dosage des paramètres hématologiques et biochimiques | 63 |
| II.4.2.3. Réalisation des coupes histologiques..... | 63 |
| II.4.3. Toxicité chronique | 63 |

| | |
|---|----|
| II.4.3.1. Dissection et prélèvement du sang et de plasma | 64 |
| II.4.3.2. Prélèvement des organes | 64 |
| II.5. Evaluation de l'activité antioxydante in vitro | 64 |
| II.5.1. Activité scavenger du radical libre DPPH· (2,2 diphényl 1 picryl hydrazine) | 64 |
| II.5.2. Test de piégeage du radical ABTS ⁺ (2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)) | 66 |
| II.5.3. Activité anti-oxydante par le test CUPRAC (CUPRIC Reducing Antioxidant Capacity) | 67 |
| II.5.4. Test de blanchissement de β-carotène | 67 |
| II.5.5. Test de Pouvoir réducteur | 68 |
| II.5.6. Test Chélation de fer | 68 |
| II.6. Activité anti-cholinestérase <i>in vitro</i> | 68 |
| II.7. Activité anti inflammatoire <i>in vitro</i> | 69 |
| II.8. Effet des extraits sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton | 69 |
| II.9. Activité analgésique | 70 |
| II.10. Analyses statistiques | 71 |

Resultats et Discussion

| | |
|---|-----------|
| I. Extraction, dosage des polyphénols, flavonoïdes et taninstotauxdes extraits | 72 |
| II. Rendement, dosage des polyphénols, flavonoïdes et tanins totaux des Fractions | 75 |
| III. Identification des composés actifs dans les extraits d'<i>Ephedra nebrodensis</i> | 77 |
| III.1. Identification des composés phénoliques par HPLC-MS | 77 |
| III.2. Identification des alcaloïdes par CPG-MS | 85 |
| IV. Etude toxicologique <i>in vivo</i> | 94 |
| IV.1. Toxicité aiguë | 94 |
| IV.1.1. Observations | 94 |
| IV.1.2. Changements de poids corporel | 95 |
| IV.1.3. Etude histologique | 96 |

| | |
|---|------------|
| IV.2. Toxicité Subaiguë | 98 |
| IV.2.1. Signes de toxicité..... | 98 |
| IV.2.2. Poids corporel, consommation alimentaire et consommation d'eau..... | 98 |
| IV.2.3. Poids des organes | 99 |
| IV.2.4. Paramètres hématologiques..... | 101 |
| IV.2.5. Paramètres biochimiques | 102 |
| IV.2.6. Etude histologique | 106 |
| IV.3. Toxicité chronique | 107 |
| IV.3.1. Poids corporel, consommation alimentaire et consommation d'eau..... | 107 |
| IV.3.2. Poids des organes | 110 |
| IV.3.3. Paramètres hématologiques..... | 111 |
| IV.3.4. Paramètres biochimiques | 113 |
| IV.3.5. Etude histologique | 115 |
| V. Activité antioxydante | 116 |
| V.1. Activité anti radicalaire des extraits vis-à-vis DPPH et ABTS | 117 |
| V.2. Activité anti radicalaire des fractions vis-à-vis DPPH et ABTS | 119 |
| V.3. Test de blanchiment du β -carotène des extraits | 121 |
| V.4. Test de blanchiment du β -carotène des fractions | 122 |
| V.5. Activité Anti-oxydante par le test de (CUPRAC)..... | 122 |
| V.6. Activité Anti-oxydante par le test du pouvoir réducteur (FRAP) des extraits | 124 |
| V.7. Activité Anti-oxydante par le test du pouvoir réducteur (FRAP) des fractions | 125 |
| V.8. Effet chélateur du fer ferreux | 126 |
| VI. Activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase <i>in vitro</i>..... | 127 |
| VII. Activité anti inflammatoire <i>in vitro</i> | 129 |
| VIII. Activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i> | 130 |
| VIII. Activité analgésique | 133 |

Conclusion et Perspectives

135

Références.....137

Introduction

Introduction

L'environnement naturel est une source pour la santé de l'homme, depuis les temps des temps. Le choix des plantes médicinales n'était pas hasard, c'était l'expérience qui guide les gens comment les utiliser. Les plantes médicinales sont des ressources importantes pour la majorité des populations rurales et urbaines d'Afrique et représentent le principal recours des populations pour se guérir (Badiaga, 2011). Malgré les avancées de la pharmacologie, l'utilisation thérapeutique des plantes médicinales est très répandue dans certains pays du monde et surtout dans les pays en développement (Tabuti et *al.*, 2003).

L'Algérie est le plus grand pays de l'Afrique. Elle est caractérisée par sa diversité en plantes médicinales et aromatiques. La richesse de la flore Algérienne est incontestable, avec environ 4300 espèces et sous-espèces de plantes vasculaires. Elle contient un grand nombre d'espèces réparties selon leur degré de rareté : 289 espèces assez rares, 647 espèces rares, 640 espèces très rares, 35 espèces extrêmement rares et 168 espèces endémiques (Hadjadj et *al.*, 2019).

Le genre *Ephédra* comprend des propriétés intéressantes ; antioxydantes, anti-asthmatiques, anti-inflammatoires, antimicrobienne, anticancéreuse et hypoglycémique. Les plantes d'*Ephédra* sont riches en composés bioactifs, notamment les polyphénols et les alcaloïdes de type éphédrine dont la teneur varie d'une espèce à l'autre (Khalil et *al.*, 2020).

L'objectif de cette étude vise la valorisation de la plante *E. nebrodensis* de la famille des Ephedraceae, comme source de molécules bioactives utilisables dans le domaine pharmaceutique. Cette plante elle est très rare, aucun rapport scientifique n'a été signalé sur *E. nebrodensis* d'origine de l'Algérie. Au niveau mondial peu d'études scientifiques ont été menées sur cette plante, aussi bien pour vérifier son efficacité que son innocuité pour les gens qui l'utilisent. Dans ce cadre, nous avons donc choisi de mener une étude scientifique sur cette plante afin de contribuer à sa valorisation par la vérification de son innocuité, la confirmation de ses indications thérapeutiques et aussi la recherche de nouvelles activités biologiques intéressantes sur cette plante.

Cette thèse comprend:

- L'extraction de la partie aérienne d'*E. nebrodensis* et fractionnement par plusieurs solvants et détermination de leurs teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins totaux.
- L'analyse phytochimique qui permet d'avoir une idée générale sur la nature des différents composés chimiques susceptibles d'être responsable des activités pharmacologiques testées.
- Etudier le profil toxicologique de l'extrait aqueux (AQ) d'*E. nebrodensis* à fin de cerner les risques encourus à la suite de son ingestion. Cette étude est focalisée sur la toxicité à court terme (toxicité aiguë) et à long terme (toxicité subaiguës et chronique) en évaluant les effets toxiques, l'évolution de poids corporel, le poids relatif des organes, les paramètres hématologiques, biochimiques et histologiques.
- Tester le pouvoir antioxydant des extraits par plusieurs tests *in vitro* (DPPH, ABTS, blanchissement du β -carotène, test du pouvoir réducteur, test Cuprac et chélation du fer ferreux).
- Evaluation de l'activité enzymatique anti-cholinestérase *in vitro* contre deux enzymes AchE et BchE.
- Les activités anti-inflammatoires (*in vitro* et *in vivo*) ont été étudiées en utilisant:
 - Inhibition de la dénaturation des protéines.
 - Œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris.
- Tester l'effet analgésique de la plante chez les souris.

Revue
Bibliographique

I. Généralité sur *Ephedra nebrodensis*

I.1. Localisation et Description

Le genre *Ephedra* est connu pour comprendre environ 40 espèces vivaces (Rydin et *al.*, 2006). Des plantes à feuilles persistantes et de sous-arbrisseaux dioïques, espèces pouvant atteindre 1,20 m de haut, avec des tiges jointes. En général, les espèces de ce genre adaptées à pousser à l'état sauvage dans des conditions arides et semi-arides présentent principalement dans les zones modérées d'Asie, Europe et Amérique du Nord (O'Dowd et *al.*, 1998 ; Pirbalouti et *al.*, 2013). Environ 25 espèces d'Ephédra se trouvent dans les régions plus sèches de l'Ancien Monde, qui s'étendent vers l'ouest de l'Asie centrale jusqu'au Europe méditerranéenne et l'Afrique du Nord, en passant par l'Asie du Sud-Ouest (Caveney et *al.*, 2001). Dans le Nouveau Monde, On trouve environ 24 espèces d'éphédra, allant du sud-ouest des États-Unis jusqu'au plateau central de Mexique, et en Amérique du Sud, ils se trouvent dans une zone de l'Équateur à la Patagonie (Caveney et *al.*, 2001). *Ephedra* se développe largement en Palestine, on trouve 5 espèces d'Ephédra qui sont *E. foeminea*, *E. alata*, *E. aphylla*, *E. ciliata* et *E. fragilis* (Danin, 2018).

E. nebrodensis est une plante médicinale (famille des Ephedraceae), arbuste fortement ramifié (Figure1), de 30-150 cm, à petites feuilles opposées au niveau des nœuds, qui sont alternés. Des fleurs en petits cônes, les mâles et femelles étant en général portés par des pieds différents. Des cônes solitaires ou réunis en glomérules devenant jaunes ou rouges à maturité. C'est une espèce saharo-arabique et méditerranéenne présente dans l'Atlas saharien, l'Anti- Atlas et le Hoggar en altitude (2000 et 3000 m) sur les rochers (Ozenda, 1958; Quezel et Santa, 1963). En Italie *E. nebrodensis* (Ephedraceae) est un arbuste sauvage qui se trouve en Sardaigne et en Sicile sur des terrains calcaires entre 200 et 1300 m d'altitude (Pignatti, 1997).

Ephedra nebrodensis est une espèce de montagne méditerranéenne, dont la répartition est fragmentée sur des sites rocheux calcaires xériques ou gypseux jusqu'à 1700 m d'altitude en Méditerranée, en Macaronésie et en Asie occidentale (Orsomando 1969 ; Amaral Franco 1986).

1.2. Classification

- Embranchement : Spermaphytes
- Sous embranchement : Gymnospermes
- Classe : Gnetopsida
- Ordre : Ephedrales
- Famille : Ephedraceae
- Genre : Ephedra
- Espèce : *Ephedra nebrodensis* (Ozenda, 1991).

Synonymes: *Ephedra nebrodensis* Tineo, *Ephedra major* Host.

Nom arabe: Amaya, Dil el Maïz.

Nom français : grand Ephédra.

1.3. Utilisation traditionnelle et propriétés pharmacologiques

Les espèces d'Ephédra ont une longue histoire dans la médecine traditionnelle chinoise (environ 5000 ans), avec des utilisations dans le traitement des allergies, de la congestion nasale, de l'asthme bronchique, de la toux et de la grippe (Hegazi et El-Lamey, 2011).

En outre, l'Ephedra montre des propriétés anticancéreuses et antimicrobiennes (Dehkordi et *al.*, 2015 ; Dosari et *al.*, 2016 ; Al-Rimawi et *al.*, 2017 ; Mendelovich et *al.*, 2017). Ils ont montré que l'extrait hydro-alcoolique d'*E. pachyclada* était efficace pour guérir expérimentalement les ulcères de rats (Pirbalouti et *al.*, 2013). Hyuga et *al.* (2016) ont décrit des propriétés médicinales importantes de ce genre, telles que des effets antimicrobiens, antioxydants, antidiabétiques, hépatoprotecteurs, cardiovasculaires et anticancéreux (Hyuga et *al.*, 2016).

Les activités de l'Ephedra comprennent des propriétés anti-asthmatiques (Liu et Luo, 2007), anti-inflammatoires (Aoki et *al.*, 2005), anti-proliférative (Danciu et *al.*, 2019), hypoglycémique (Xiu et *al.*, 2001 ; Ben Lamine et *al.*, 2019) et de réduction du poids (Roh et *al.*, 2017; Lim et *al.*, 2018 ; Lee et *al.*, 2019).

Nam et *al.* Ont montré qu'une fraction aqueuse d'*E. sinica* Stapf. Avait des effets anti-invasifs, antiangiogéniques et antitumoraux dans un modèle murin de mélanome murin (Nam et *al.*, 2003).

L'extrait hydroalcoolique obtenu à partir de l'*E. campylopoda* a été doté de propriétés antioxydantes, antibactériennes et antiprolifératives *in vitro* contre les lignées cellulaires HT 29 et HCT 116 du cancer du côlon (Mohamad et *al.*, 2016).

L'extrait d'*E. fragilis* Desf a suscité une activité immunostimulante dans un modèle *in vitro* utilisant des lymphocytes périphériques humains (Attard et Vella, 2009).

L'extrait éthanolique de feuilles et le jus de fruit d'*E. foeminea* ont réduit la viabilité des cellules cancéreuses *in vitro*, tandis que l'extrait aqueux a réduit la cytotoxicité dans toutes les lignées cellulaires (Mendelovich et *al.*, 2017).

Les plantes du genre Ephedra, y compris *Ephedra major* et d'autres, ont traditionnellement été utilisées à des fins médicinales diverses, notamment le traitement du rhume des foins, de l'asthme et du rhume ordinaire. Les membres de ce genre contiennent divers alcaloïdes actifs sur le plan médicinal (mais notamment de l'éphédrine) et sont largement utilisés dans les préparations pour le traitement de l'asthme. Les composés de l'*Ephedra major* contenant des alcaloïdes jouent un rôle efficace dans le traitement de nombreuses maladies (Abourashed et *al.*, 2003).

Les alcaloïdes éphédrine et pseudoéphédrine sont les constituants actifs du genre Ephedra. Ils sont utilisés pour traiter l'hypotension artérielle, mais des alternatives à risque cardiovasculaire réduit l'ont remplacé pour traiter l'asthme. La plante entière peut être utilisée à des concentrations beaucoup plus faibles que les constituants isolés, contrairement à l'éphédrine isolée, l'utilisation de la plante entière entraîne rarement des effets secondaires (Kapner, 1997).

La plante a également des effets antiviraux, en particulier contre la grippe. Les tiges sont diaphorétiques, diurétiques, fébrifuge, hypertendu, nerveux, tonique, vasoconstricteur et des propriétés vasodilatatrices (Yeung, 1985).

Floradal et Svensson (1992) ont signalé certains effets hémostatiques de l'éphédrine. La plante a une activité bronchodilatatrice, elle est également utilisée pour traiter la myasthénie grave

(Farnsworth, 1995 ; Goodman et Gilman, 1993; OMS, 1989), comme analgésique, stimulant immunitaire et agent antiviral (Konno, 1979 ; Kim et *al.*, 1991).

I.4. Phytochimie de la plante

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

Aujourd'hui, l'importance principale des espèces d'Ephedra dans le domaine médical est due à la présence d'alcaloïdes dérivés de la phénylalanine (comme l'éphédrine et d'autres composés apparentés, tels que la pseudoéphédrine, la norpseudoéphédrine, la noréphédrine, la méthyléphédrine et la méthylpseudoéphédrine), qui agissent sur le système nerveux sympathique comme un sympathomimétique (Ibragic et Sofić, 2015).

E. nebrodensis (Tineo), Cette espèce est la plus riche source d'éphédrine en Inde ; les tiges contiennent plus de 2,5 % d'alcaloïdes totaux, dont environ 75 % est l'éphédrine (Chopra, 1986).

Tableau 1: Alcaloïdes, flavonoïdes et acides phénoliques identifiés dans l'espèce *Ephedra nebrodensis*.

| Classification | Noms chimiques | Références |
|--------------------------------------|---|---|
| Alcaloïdes De type amphétamine | D(-)- Ephédrine | (Aghdasi et <i>al.</i> , 2016; Cottiglia et <i>al.</i> , 2005) |
| | L(+)- Pseudoéphédrine | |
| | D(-) Norephedrine | |
| | D(-) Méthyléphédrine | |
| | L(+)- Méthylpseudoéphédrine | (Ballero et <i>al.</i> , 2010) |
| Flavanols | (-)-Epicatechin | (Amakura et <i>al.</i> , 2013 ;Cottiglia et <i>al.</i> , 2005) |
| Acides phénoliques | Nebrodenside A Nebrodenside B Acide- <i>O</i> -coumarique Glucoside | (Ballero et <i>al.</i> , 2010 ; Cottiglia et <i>al.</i> , 2005) |

Cottiglia et al. (2005) ont isolé deux phénoliques glycosides de *E. nebrodensis* Tineo, à savoir le 4-hydroxy-3-(3-méthyl-2-butényl)phényl -*D*-glucopyranoside (nébrodenside A) et l'acide *O*-coumarique -*D*-allopyranoside (nébrodenside B), ainsi que le glucoside de l'acide *O*-coumarique, l'épicatéchine(-) et l'épédrine(-) provenant de parties aériennes et a constaté que l'(-)épicatéchine a une faible activité antivirale contre le virus de la grippe A et une très faible cytotoxicité (Tableau 1).

En plus des alcaloïdes, l'éphédra est riche en composés phénoliques antioxydants tels que l'acide transcinnamique, la catéchine, la syringine, l'épicatéchine, le symplocoside, le kaempférol 3-*O*-rhamnoside-7-*O*-glucoside et l'isovitexine-*O*-rhamnoside qui ont contribué de manière significative au potentiel antioxydant de la plante (Amakura et al., 2013).

L'extrait éthanolique de la partie aérienne de l'*E. alata* Decne, originaire du sud de la Tunisie (Djerba), contient des phytoconstitués polyphénoliques et exerce une activité antioxydante. Les résultats de la LC-MS montrent que, parmi les composés polyphénoliques sélectionnés, l'extrait contient du kaempférol, de l'épicatéchine et de la quercétine (Danciu et al., 2019).

D'après Abourashed et al. (2003) Les flavones, les flavanols, les bisflavanols et les acides carboxyliques seraient les principaux produits phytochimiques ainsi que des alcaloïdes présentent dans l'Ephedra. Aussi Les espèces d'éphédra sont constitués par des flavonoïdes comprennent les diglycosylflavones, les flavonol-3-*O*-glycosides et les proanthocyanidines (Chebouat et al., 2014). De plus, l'huile essentielle a été indiquée pour être parmi les principaux composants de cette plante (Jerbi et al., 2016).

D'après l'étude d'Al-khateeb et al. (2014), ils ont trouvés que les deux espèces végétales, *E. alata* et *E. transitoria*, cultivées à l'état sauvage en Irak, contiennent respectivement les amines alcaloïdes éphédrine et pseudoéphédrine (0,25% et 0,38%).

I.5. Recherches récentes sur *E. nebrodensis*

Sureka et al. (2016) reporte que la partie aérienne d'*E. nebrodensis* de la famille des Ephedraceae, parmi les plantes cardio-protecteurs, avec phyto-constituants (*O*-coumaric acid beta d-allopyranoside) par l'augmentation des niveaux d'antioxydants.

D'après le contexte de Hachi et al. (2016). une étude ethnobotanique a été menée dans la région du Moyen- Atlas centrale Orient (Maroc), ils ont identifié une liste des plantes médicinales hypoglycémiques utilisées par la population. *E. nebrodensis* elle a été citée dans

le catalogue des plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle dans le traitement du diabète.

La consommation à court terme et à faible dose de L'extrait hydro-éthanolique d'*E.major*, il a un effet protecteur chez les patients cirrhotiques (Hassanzadeh et *al.*, 2014).

Ballero et *al.* (2010) ils ont trouvé que l'extrait d'éthanol : acétone d'*E. nebrodensis* Tineo de la Sardaigne a des activités antihistaminiques, adaptogènes, antinociceptives, anti-inflammatoires et antioxydantes. Les données reportées par Shah et *al.* (2009) suggère que l'extrait d'éthanol : acetone d'*E. nebrodensis*, qui est riche en flavonoïdes, il a un potentiel de prévention contre les effets cardiotoxiques induits par la doxorubicine.

I.6. Propriétés pharmacologiques de l'éphédrine

L'éphédrine et de la pseudoéphédrine, des substances de type phényléthylamine qui possèdent des effets stimulants sur le SNC similaires à ceux des amphétamines (Glennon et Young, 2000), bien que moins importante En périphérie, elle agit sur les récepteurs α et β adrenergiques Au niveau central, l'éphédrine favorise la libération et inhibe l'absorption de la noradrénaline, ce qui entraîne une diminution de la consommation alimentaire et favorise la satiété, via les centres hypothalamiques contrôlant l'appétit (Astrup et *al.*, 1995 ; Carek et Dickerson, 1999).

Munhall et Johnson (2006) ont signalé que l'éphédrine a des actions dopaminergiques significatives dans le système nerveux central, elle provoque une hyperpolarisation et supprime les effets médiés par les récepteurs GABA_B en libérant de la dopamine endogène.

De plus, l'éphédrine améliore la thermogénèse, augmentant la dépense énergétique qui contribue également à la réduction du poids ; l'effet thermogénique de l'éphédrine est en raison de sa stimulation périphérique des récepteurs β (Dulloo, 1993; Carek et Dickerson, 1999). En tant que stimulant du SNC, l'éphédrine peut provoquer des insomnies, nervosité, tremblements et anxiété. Thérapie à long terme avec l'éphédrine à fortes doses peut provoquer des épisodes psychotiques comme la paranoïa, les hallucinations et autres troubles mentaux (Poston et Foreyt, 1998; Whitehouse, 1987). La mort a été signalée à la suite de l'utilisation chronique de l'extrait d'Ephedra (en Chine) (Theoharides, 1997). Dans une enquête téléphonique réalisée aux États-Unis, 1 % sur 14 649 personnes ont déclaré avoir utilisé des produits à base d'Ephedra à des fins de perte de poids (Blanck et *al.*, 2001). Ephedrine et la

pseudoéphédrine ont également été utilisée par les athlètes pour améliorer leurs performances ; c'est pourquoi Le Comité Olympique International a interdit leur utilisation (Gill et *al.*, 2000). Ephédrine provoque également une hyperlocomotion et des stéréotypes chez les animaux (Wellman et *al.*, 1998).

II. Toxicité des plantes

II.1. Généralités sur la toxicité et effets toxiques

La toxicité est définie comme une série de réactions indésirables, qui peuvent être des altérations morphologiques et fonctionnelles du corps vivant causées par des substances introduites à doses uniques relativement élevées ou à de petites doses répétées à long terme (Hodgson, 2004).

Un toxique est appelé composé qui peut nuire à la santé des organismes vivants, en particulier des humains. L'effet des substances toxiques dépend toujours de l'espèce et de la dose, et dépend aussi de la source. Il existe une différence entre les substances toxiques synthétiques et les substances toxiques naturelles (toxines) dérivées de micro-organismes, d'animaux et de plantes (Reichel et *al.*, 2004).

Les effets toxiques sont définis comme "une réaction nocive d'un système biologique à des composés toxiques, et la mort de cellules ou d'organismes entiers est la réaction principale" (Timbrell, 2002).

L'étude de la toxicité d'une substance est un ensemble de tests pharmacologiques qui déterminent le degré ou la nocivité d'un produit pour ajuster son utilisation. Évaluer l'effet des substances toxiques en fonction de plusieurs paramètres, dont le mode d'administration (oral, intraveineux, intra-péritonéal), la posologie, la mortalité observée, le changement de poids, l'histologie de certains organes et les paramètres biochimiques. Les changements sont appelés marqueurs de toxicité, tels que les transaminases (ALAT, ASAT), la bilirubine, la créatinine et l'urée (Serrano, 1990).

Dans tous les cas, les effets toxiques sont généralement dus à une exposition aiguë ou chronique à des composés toxiques par ingestion, inhalation ou absorption orale, aussi après contact cutané (Timbrell, 2002). Les effets toxiques sont considérés comme des signes ou des reflets de perturbations dans les activités normales des enzymes. Ces derniers jouent un rôle biochimique important dans toutes les formes de vie (Pascoe, 1983; Timbrell, 2002).

II.2. Tests de toxicité

II.2.1. Toxicité aiguë

La toxicité aiguë d'une substance correspond aux effets indésirables qui se manifestent après administration orale ou cutanée d'une dose unique, ou plusieurs après un intervalle de 24 heures ou une exposition de 4 heures par inhalation (Claverie et Hedde, 2008).

L'étude de la toxicité aiguë aboutit classiquement à la détermination de la dose létale 50 (DL₅₀), qui désigne la dose d'une substance causant la mort de 50% d'une population animale dans des conditions d'expérimentation précises. De ce fait, la mesure de la DL₅₀ peut établir un classement de ces substances plus qu'elle est faible, plus que la substance est toxique, et l'inverse est juste (Tableau 2) (Reichl, 2004).

Tableau 2: Classification d'une substance toxique basée sur une gamme de doses DL₅₀ (Loomis et Hayes, 1996).

| Catégorie | DL ₅₀ (mg/kg) (Orale) |
|------------------------------|----------------------------------|
| Extrêmement toxique | ≤ à 1 |
| Très toxique | 1 à 50 |
| modérément toxique | 50 à 500 |
| légèrement toxique | 500 à 5000 |
| particulièrement non toxique | 5000 à 15000 |
| relativement sans danger | > 15000 |

Cependant, la DL₅₀ a une valeur très limitée, car elle ne concerne que le taux de la mortalité et ne donne aucune information sur les mécanismes en jeu et la nature des lésions. Il s'agit d'une appréciation grossière et préliminaire (première analyse) qui peut être influencée par plusieurs facteurs tels que l'espèce animale, le sexe, l'âge, le moment de traitement ... etc (Lapointe, 2004).

II.2.2. Toxicité subaiguë

La réalisation d'essais à doses répétées à court terme (de 1 à 4 semaines) pour obtenir des informations sur la toxicité de la substance après l'administration des doses répétées est généralement nécessaire pour la conception réussie d'études subaiguës (Eaton et Gliber, 2008 ; Wilson *et al.*, 2001).

D'après (Claverie et Hedde, 2008), la toxicité sub-chronique c'est l'administration de xénobiotique plusieurs fois pendant une période plus longue (de 28 à 90 jours). On cherche à définir les organes et les fonctions touchées par ce toxique. Pour une dose déterminée l'effet attendu peut se manifester immédiatement ou après.

II.2.3. Toxicité chronique

La toxicité chronique est définie comme étant la mise en évidence d'effets toxiques après l'administration répétée d'une dose de la substance à tester, pendant une longue période, supérieure à 90 jours (Boukeloua, 2009).

Selon l'Association of Vermont Recyclers, (1996) La toxicité chronique est définie comme "la capacité d'une substance à provoquer des effets toxiques sur la santé des êtres humains, des animaux, des poissons et d'autres organismes après des expositions multiples survenant sur une période prolongée ou sur une fraction importante de la vie d'un animal ou d'un être humain".

Selon les espèces utilisées, différentes méthodes de recherche de dosage peuvent être utilisées. La procédure utilisée peut varier, mais implique généralement d'exposer des animaux de laboratoire (groupe / sexe / groupe typique de 2 à 5 animaux) à différentes doses de la substance d'essai, la dose non létale maximale (déterminée dans les études de toxicité aiguë), jusqu'à la dose comprise dans la plage de doses pharmacologiques. Ensuite, les paramètres biochimiques et d'hématologiques ont été mesurés au début de l'étude (48 heures après la première dose) et à la fin de l'expérience, une dissection complète de tous les tissus anormaux et des principaux organes (tels que le cœur, le foie, les reins, les poumons et le cerveau de l'animal) peut être effectuée et une analyse histopathologique a été réalisée à la fin de l'étude (Poole et Leslie, 1989; Timbrell, 2002).

Les tests de toxicité chronique et à long terme ne peuvent pas détecter toutes les formes de toxicité, c'est pour cela est nécessaire d'effectuer des tests spécifiques comme test de

tératogénicité, test de reprotoxicité, test de mutagenèse, test de tumorigénicité et de carcinogénicité (Loomis et Hayes, 1996; Timbrell, 2002).

II.3. Toxicité des plantes médicinales

Les plantes médicinales occupent une place importante dans notre vie quotidienne et sont souvent utilisées comme source de traitement pour diverses maladies (da Silva et *al.*, 2014). On estime qu'environ 80% de la population mondiale dépend des soins de santé primaires traditionnels que sont les médicaments. Soins de santé, en particulier dans les pays et régions sous-développés (Xiang et *al.*, 2015). L'acceptation généralisée de la médecine traditionnelle peut être attribuée à son accessibilité, son prix économique et sa base expérimentale historique (Fabricant et Farnsworth, 2001). Le recours aux herbes ayant une valeur thérapeutique potentielle a favorisé la recherche pharmacologique et phytochimique pour évaluer leur valeur médicinale, leur composition chimique et leur potentiel de découverte de médicaments. Selon les connaissances éthiques locales et la pharmacologie scientifique des plantes médicinales, de nombreux médicaments cliniques et aliments fonctionnels ont été découverts, tels que les boissons à base de plantes, les thés, les infusions et les extraits secondaires ou métabolites de boissons ces dernières années (Ahmad et *al.*, 2016 ; Begas et *al.*, 2017 ; Kogiannou et *al.*, 2013 ; Pereira et *al.*, 2017). Cependant, les études scientifiques et expérimentales de toxicité sur les médicaments traditionnels sont insuffisantes, ce qui peut fournir une vue d'ensemble sûre et efficace des applications pratiques dans les communautés locales (Debjit et *al.*, 2009). Afin de l'appliquer complètement, il est de plus en plus nécessaire d'évaluer leur sécurité et d'assurer une stabilité et une qualité et une efficacité suffisantes (Thelingwani et Masimirembwa, 2014).

II.3.1. Causes de toxicité des plantes

La toxicité des plantes médicinales peut s'expliquer par plusieurs facteurs, comme montre le Tableau 3.

II.4. Hépatotoxicité

II.4.1. Physiologie et anatomie du foie

Le foie est le plus grand organe du corps humain, représentant environ (2-3%) du poids corporel moyen. Il pèse environ 1500g et est situé dans le coin supérieur droit de l'abdomen.

Cet organe est étroitement lié à l'intestin grêle. Le falciforme divise le foie en deux lobes (droit et gauche) et chaque lobe est divisée en lobules. Le foie est protégé par la capsule Glisson (McCuskey et *al.*, 2012).

Tableau 3: Certains facteurs de la toxicité des plantes médicinales (Zekkour, 2008).

| Causes | Mécanismes |
|---|---|
| La toxicité intrinsèque des composés | Les plantes médicinales sont des mélanges complexes de diverses molécules. Leur composition n'est pas généralement claire et sont composés de molécules ayant une activité biologique évidente, notamment des hétérosides, des alcaloïdes, des anthocyanes, des tanins et des stéroïdes. Comme toutes les molécules biologiquement actives, ces molécules peuvent présenter une toxicité intrinsèque à une certaine concentration. Tout comme la composition d'un produit végétal (qui change de plusieurs façons), la teneur de ces ingrédients varié «naturellement» entre les formulations |
| La reconnaissance inexacte des composants | Si l'une des molécules d'une préparation à base de plantes (qui peut avoir de graves effets toxiques) n'est pas reconnu ou n'est pas bien reconnu, il peut devenir toxique: en 1991 et 1992, le mélange de <i>Aristolocha fangchi</i> et <i>Stephania tetrandra</i> a été utilisé dans les préparations amaigrissantes, Il a été la cause de graves maladies rénales chez les consommatrices. |
| Les altérations (changements) | La toxicité peut également être liée à la modification chimique des constituants des préparations à base de plantes, que ces ingrédients soient des plantes ou des produits chimiques médicinaux. |
| Les contaminations (la pollution) | Les produits à base de plantes peuvent contenir des contaminants toxiques tels que des pesticides et des métaux lourds, ainsi que du pollen, des champignons et des moisissures qui peuvent provoquer des réactions allergiques et / ou toxiques |

Le foie est un organe important que l'on ne trouve que chez les vertébrés, Il a un large éventail de fonctions, y compris la détoxification de divers métabolites, la synthèse des protéines, le métabolisme des graisses, notamment en régulant le stockage du glycogène et l'homéostasie

lipidique (Su *et al.*, 2019), aussi la synthèse et la sécrétion de la bile (Horn *et al.*, 2005; Young *et al.*, 2008).

Les principales cellules fonctionnelles du foie sont des cellules épithéliales appelées hépatocytes. Les cellules hépatiques sont séparées par une courbe sinusoidale de vaisseaux sanguins minces dans lesquels le sang circule. Par conséquent, le foie a la particularité d'être irrigué par le sang artériel et le sang veineux en même temps et drainer par un système veineux séparé. Après avoir passé dans les sinusoides, le sang passe à travers la veine hépatique jusqu'à la veine cave inférieure (Figure 1). Les plus gros vaisseaux sanguins et conduits traversent le foie dans le réseau de ramification naturel du collagène, c'est l'espace porte. Ces espaces contiennent également des canaux biliaires, qui transportent la bile vers l'intestin grêle où elle est sécrétée (Figure 1) (Horn *et al.*, 2005; Young *et al.*, 2008).

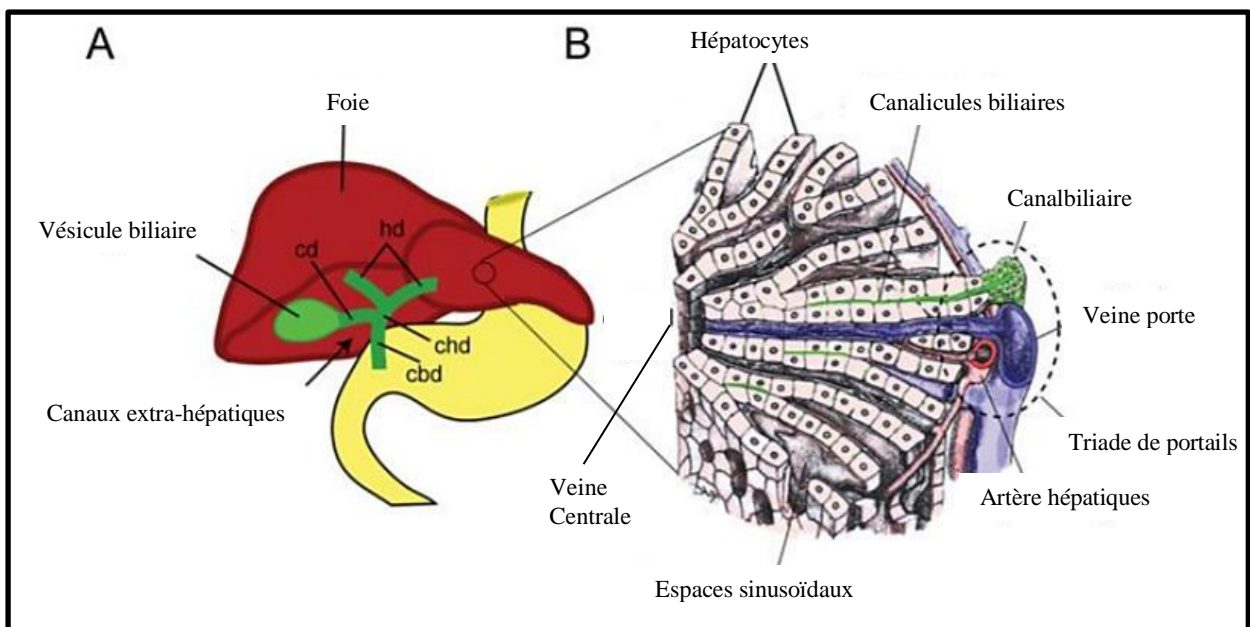


Figure 1: (A) Le schéma montre un foie adulte. (B) Schéma de l'architecture cellulaire du foie (Ozougwu, 2017).

II.4.2. Principales lésions hépatiques

Le foie est le site principal de la biotransformation des xénobiotiques. Toute maladie du foie (stéatose, cirrhose, nécrose) modifiera son métabolisme, ce qui à son tour modifiera sa toxicité (Viala, 2007).

II.4.2.1. Stéatose

La stéatose hépatique ou foie gras est simplement l'accumulation de vacuoles de graisse dans les hépatocytes. C'est une réponse commune à diverses hépatotoxines et représente une lésion potentiellement réversible (Treinen-Moslen, 2001). Le foie affecté est grossièrement gonflé, En raison de l'accumulation de graisse (Plumlee, 2004). Les composés qui produisent une stéatose importante associée à la mortalité comprennent l'acide valproïque, médicament antiépileptique, et la fialuridine, agent antiviral. Autres toxines qui provoquent la stéatose hépatique sont aflatoxine, éthanol et CCl₄.

La stéatose macrovésiculaire, plus fréquente chez les animaux domestiques, décrit des hépatocytes contenant une, ou parfois quelques, grande(s) vacuole(s) graisseuse(s) qui déplacent du noyau à la périphérie du cytoplasme. elle indique un déséquilibre entre l'absorption des acides gras et la sécrétion de lipoprotéines de très faible densité secondaire, qui conduit à une mobilisation accrue des triglycérides, à une diminution de l'oxydation des acides gras, à une diminution de la synthèse des lipoprotéines ou à d'autres anomalies métaboliques (Plumlee, 2004).

II.4.2.2. Nécrose

La nécrose est la forme prédominante de mort cellulaire dans la plupart des agressions toxiques. Des modifications dégénératives de l'hépatocyte visibles au microscope peuvent précéder la nécrose. Les cellules perdent leur homéostasie osmotique et se gonflent.

La nécrose est souvent provoquée par des dommages aux membranes, soit la membrane plasmique de la cellule, soit les membranes des organites, en particulier les mitochondries.

Les dommages à la membrane plasmique interfèrent avec la régulation des ions ; les dommages aux membranes des mitochondries interfèrent avec l'homéostasie du calcium et la production d'énergie ; et les dommages à la membrane du réticulum endoplasmique lisse diminuent la capacité de cet organite à capter le calcium. L'inhibition de la synthèse des protéines est un autre mécanisme de la nécrose cellulaire (Bischoff et *al.*, 2018).

II.4.2.3. Cirrhose

La cirrhose hépatique est une maladie du foie en phase terminale. Elle décrit des changements irréversibles caractérisés par l'accumulation d'un dépôt excessif de collagène sous forme de

fibrose accumulé, perturbant l'architecture hépatique. Les hépatocytes piégés subissent une mitose et une croissance aléatoires, appelées régénération nodulaire. La cirrhose est soit micronodulaire soit macro-nodulaire, selon la quantité de fibrose et la régénération des tissus.

A ce stade, Les concentrations sériques de transaminases sont faibles en raison du manque d'hépatocytes fonctionnels. Les acides biliaires et l'ammoniaque sont nettement élevés en raison de la perte de la fonction hépatique (Bischoff et *al.*, 2018).

II.4.3. Marqueurs biologiques de la fonction hépatique

Il existe plusieurs paramètres pour évaluer la fonction hépatique, parmi eux les transaminases, bilirubine, phosphatases alcalines, Les Gamma-glutamyl transpeptidases et l'albumine, comme indique dans le Tableau 4.

Tableau 4: Paramètres biologiques de la fonction hépatique (Decock, 2018).

| | |
|--------------------------|---|
| Les transaminases | Les transaminases sont les enzymes ALAT (Alanine-aminotransférase) et ASAT (Aspartate-aminotransférase). Elles sont présentes dans plusieurs tissus (principalement le foie et les muscles) et reflètent l'activité et la destruction cellulaire de ces organes. L'augmentation de leur taux sanguin témoigne d'une lésion cellulaire. Dans le foie, la concentration en ALAT est supérieure à celle d'ASAT, dans le muscle c'est l'inverse. Ainsi, une élévation des transaminases prédominante sur ALAT indiquera une anomalie au niveau hépatique, alors qu'une prédominance sur ASAT indiquera une anomalie musculaire. |
| La bilirubine | La bilirubine est un pigment jaune provenant de la dégradation de l'hémoglobine et dont l'accumulation anormale dans le sang et les tissus détermine un ictère. La bilirubine est dite « libre » jusqu'à son passage dans le foie et « conjuguée » ensuite. Le taux de « bilirubine totale » est la somme des taux de bilirubine libre et conjuguée. Une augmentation de la bilirubine libre signe une hémolyse ou un défaut de conjugaison et une augmentation de la bilirubine conjuguée oriente vers une cholestase intra hépatique (hépatite, cirrhose) ou extra hépatique (obstruction biliaire). |

| | |
|---|--|
| Les phosphatases alcalines | Les Phosphatases alcalines (PAL) sont des enzymes majoritairement localisées dans les microvillosités des canalicules biliaires et au pôle sinusoidal des hépatocytes (elles sont également très présentes au niveau osseux). Leurs taux sont augmentés lors d'une cholestase ou d'atteinte osseuse. La cholestase peut être intra hépatique (stéatose, cirrhose) ou extra hépatique (lithiase et obstruction biliaire). |
| Les Gamma-glutamyl transpeptidases | Les Gamma-glutamyl transpeptidases (GGT) sont des enzymes provenant de plusieurs organes (foie, pancréas, rein) et participant au transfert des acides aminés entre les cellules. Le dosage sanguin des gamma-GT permet d'évaluer l'activité hépatique. Un taux anormalement élevé peut être retrouvé lors d'une atteinte hépatique |
| L'albumine | L'albumine est la protéine sanguine majoritaire : elle constitue 50 à 65% du plasma sanguin. Cette protéine est exclusivement synthétisée par le foie. Elle joue un rôle dans le transport de nombreuses molécules, notamment le transport de la bilirubine. On observe sa diminution en cas d'insuffisance hépatocellulaire |

II.5. Néphro-toxicité

II.5.1. Physiologie rénale

Les reins jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'équilibre hydro-électrolytique et acido-basique. Il assure également l'excrétion des déchets métaboliques et des produits exogènes, tout en conservant les éléments essentiels pour le corps humain (Newman et *al.*, 2005). Il a également la fonction endocrinienne principale, en tant que partie de la synthèse hormonale (érythropoïétine, rénine, prostaglandine, calcitriol), et la seconde est comme site d'action de synthétisée ou d'activée d'autres hormones (aldostérone, angiotensine II, vasopressine) (Newman et *al.*, 2005).

Le rein est particulièrement vulnérable aux dommages causés par diverses substances toxiques, qui peuvent l'endommager dans diverses parties, détruisant ainsi certaines de ses fonctions (Hillal et *al.*, 2005). Les facteurs de fragilité du rein sont: le niveau élevé de toxines délivrées au rein en raison de sa grande quantité de perfusion, la grande surface de l'épithélium tubulaire rénal (fournissant un site d'interaction et de piégeage des toxines), des

protéines de transport spécifiques qui favorisent l'internalisation, Mécanisme normal de concentration rénale (qui peut augmenter la concentration de substances non absorbées dans l'urine et l'interstitiel), le processus métabolique des cellules tubulaires rénales (qui peut conduire à des métabolites toxiques), et finalement le taux métabolique élevé requis pour le fonctionnement normal des cellules rénales (Weinberg, 1993) .

II.5.2. Structure rénale

Les molécules néphrotoxiques peuvent interférer avec le fonctionnement du rein ou modifier sa structure. Par conséquent, la compréhension de la structure et de la physiologie du rein est essentielle pour comprendre la pathogenèse et la physiopathologie de diverses néphropathies induites par certains xénobiotiques.

- Le rein est situé rétropéritonéalement dans la zone supérieure de la taille. Chaque rein a une échancrure médiale (hile rénal) où vous pouvez voir l'artère rénale, la veine rénale et l'uretère. Chaque rein est contenu dans une capsule fibreuse résistante. La capsule de tissu adipeux attache le rein à la paroi arrière de la cavité abdominale
- Au niveau de coupe frontale du rein, on distingue trois parties, à savoir le cortex rénal, la médulla rénale et le bassin rénal de l'extérieur vers l'intérieur. L'extension du bassin rénal (Calices rénaux) entoure le sommet de pyramide rénale et en recueille l'urine (Figure 2).

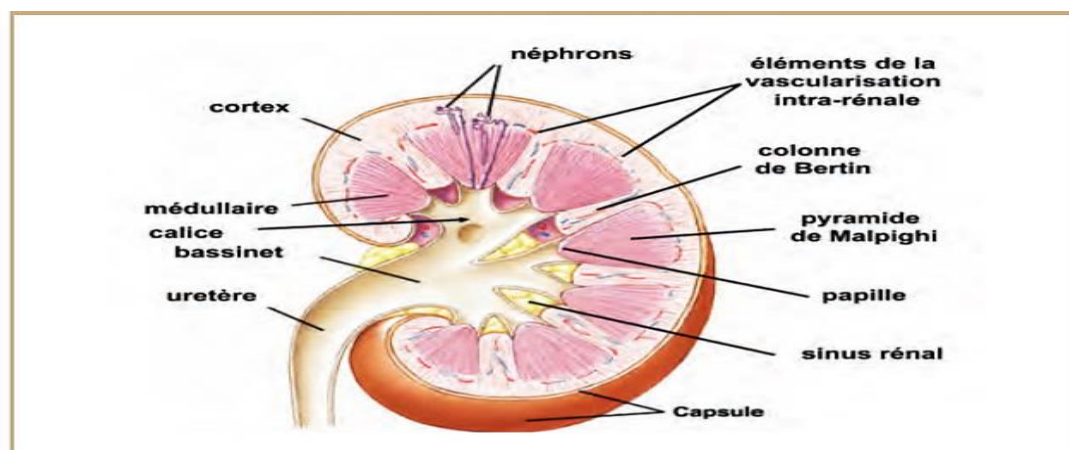


Figure 2: Coupe d'un rein (Bernard, 2013).

- L'artère rénale entrant dans le rein est divisée en une artère segmentaire, puis divisée en une artère inter lobulaire qui pénètre dans la médulla rénale et orientée vers l'extérieur. Ensuite,

l'artère inter lobulaire produit une artère arquée, qui se divise en artères inter lobulaires qui irriguent le cortex rénal. Les veines qui transportent le sang hors des reins circulent dans la direction opposée des artères et portent des noms similaires à ceux de ces artères.

- Le néphron est l'unité structurelle et fonctionnelle du rein. Chaque néphron comprend des glomérules et des tubules (Figure 3). Les subdivisions des tubules rénaux sont à partir du glomérule (la capsule de Bowman), les tubules contournés proximal, l'anse du néphron et les tubules contournés distal (Marieb, 2008).

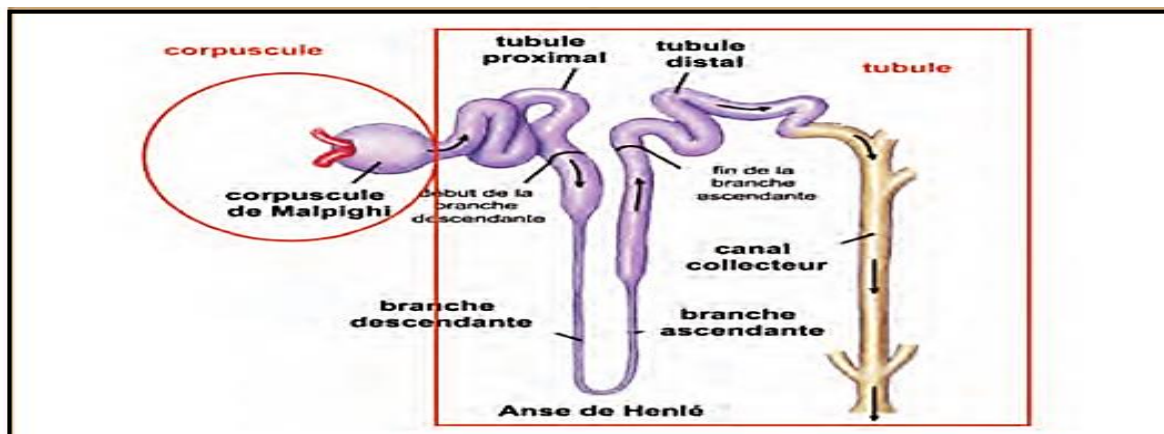


Figure 3: Schéma d'un néphron avec le corpuscule de Malpighi et les différentes parties des tubules (Bernard, 2013).

II.5.3. Principales lésions rénales

Toutes les zones du néphron peuvent être sensibles aux effets nocifs des substances toxiques, allant de modifications biochimiques mineures à un dysfonctionnement rénal mineur, à la mort cellulaire conduisant à une insuffisance rénale (Frank, 1992).

- **Nécrose des cellules épithéliales:** Dans la nécrose, les cellules épithéliales peuvent se propager dans tout le système tubulaire ou prédominer dans la partie distale du tube contourné.

- **Vacuolisation épithéliale:** les cellules épithéliales tubulaires peuvent gonfler et remplir la lumière plus ou moins complètement la lumière de tube. Son cytoplasme clair contient de nombreuses petites vacuoles, en particulier dans le tube proximal (Richet, 1988).

II.5.4. Marqueurs biochimiques rénale

Il existe de nombreux moyens pour évaluer la fonction rénale :

II.5.4.1. Dosages sanguins

- **L'urée**

L'urée est la principale voie d'élimination des déchets azotés provenant des protéines et des acides aminés. Elle est synthétisée dans le foie pendant de la dégradation d'acides aminés. Elle est ensuite sécrétée dans le sang et excrété dans l'urine par les reins. La concentration d'urée dans l'urine est un indicateur des apports protidiques et le reflet de la fonction rénale lorsqu'elle est combinée à d'urée sanguine. Toutefois, l'urémie peut être influencée par un apport alimentaire riche en protéines. C'est pourquoi, le dosage de la créatinine sanguine est réservé afin d'évaluer la fonction rénale (Kubab et *al.*, 2006).

- **La créatinine**

La créatinine sérique est un paramètre pour évaluer la fonction rénale. Elle provient d'une petite molécule issue du catabolisme musculaire qui circule librement dans le sérum et qui est filtrée par les glomérules (Dussol, 2011). Le dosage de la créatinine dans le plasma c'est (la créatininémie), ou dans les urines appelé (la créatininurie). La méthode de dosage peut être colorimétrique mais de plus en plus enzymatique (Leriverend et *al.*, 2016). La créatininémie ne dépend pas de l'apport alimentaire ou de l'hydratation). Elle est le reflet de la masse musculaire maigre, et est donc plus faible chez les enfants et les femmes. Son dosage est très utilisé dans le cas des insuffisances rénales et dans la recherche de toxicités rénales par les médicaments (Leriverend et *al.*, 2016).

- **L'ionogramme sanguin**

Permet de tester la fonction des tubules rénaux. Il mesure le taux de certains ions dans le sang : la natremie (Na^+), la kaliémie (K^+), la chlorémie (Cl^-), le bicarbonate (HCO_3^-). En cas d'insuffisance rénale (IR), les niveaux de la kaliémie sont augmentés, par contre les taux de bicarbonates sont diminués en cas d'insuffisance rénale chronique.

II.5.4.2. Dosages urinaires

Ils sont effectués sur un échantillon d'urines des 24 heures, notamment pour la recherche de la protéinurie

- **La protéinurie**

Permet de vérifier l'intégrité du glomérule rénal. Les protéines sont normalement non détectables dans l'urine, mais leur présence peut être effectuée et recommandé par le médecin (Berthélémy, 2015).

III. Stress oxydatif et antioxydant

III.1. Stress oxydatif

III.1.1. Définition

Le stress oxydatif a été défini comme le manque d'équilibre entre la présence d'espèces réactives d'oxygène/azote (ERO/ERN) et la capacité de l'organisme à neutraliser leur action par les systèmes de protection antioxydants (Persson et *al.*, 2014).

Le stress oxydatif est causé par une augmentation de la production d'ERO / ERN ou une diminution de la protection antioxydante, et se caractérise par une diminution de la capacité du système endogène à résister aux attaques oxydatives contre les biomolécules cibles. Sa gravité est liée à de nombreuses maladies, telles que les maladies cardiovasculaires, le cancer et le vieillissement (López-Alarcón et Denicola, 2013).

III.1.2. Espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Les radicaux libres représentent des espèces chimiques réactives avec des électrons non appariés dans l'orbite externe (Poljsak et *al.*, 2013; Riley, 1994), et ils ont la capacité d'exister indépendamment (Gutteridge, 1994).

Les espèces réactives à l'oxygène tels que les radicaux : superoxyde, hydroxyle, peroxyde ($\text{RO}_2\bullet$), alcoxyle ($\text{RO}\bullet$) et hydroperoxyde ($\text{H}_2\text{O}_2\bullet$) et les espèces réactives à l'azote comme oxyde nitrique et dioxyde d'azote ($\text{NO}\bullet$ et $\text{NO}_2\bullet$). Les ERO comprennent les espèces radicalaires et non radicalaires (Evans et Halliwell, 2001). Les radicaux de l'oxygène et de l'azote peuvent être transformés en non-radicaux, tels que le peroxyde d'hydrogène, l'acide hypochloreux (HOCl), l'acide hypobromeux (HOBr), le peroxyde nitrite (ONOO) et l'oxygène singulet ($1/2 \text{O}_2$) (Tableau 5) (Kumar, 2011a).

L'oxyde azoté et le dioxyde d'azote présentent des électrons non appariés, et peuvent donc être considérés comme des radicaux libres (Gutteridge, 1994). L'oxyde nitrique endogène, biosynthétisé à partir de l'arginine, d'oxygène et de NADPH, par des enzymes appartenant à la classe des synthases de l'oxyde nitrique ou par réduction du nitrate inorganique, est l'une des rares molécules de signalisation gazeuse impliquées dans la vasodilatation et la neurotransmission. Elle est également libérée par les phagocytes (monocytes, macrophages et neutrophiles) à la suite de la réaction du système immunitaire. Il réagit avec l'anion radical

superoxyde, donnant une espèce d'azote très réactive et nuisible, à savoir le peroxyde d'azote, un oxydant puissant par rapport à de nombreuses molécules biologiques. Le peroxyde d'azote peut être décomposé pour donner des radicaux hydroxyles, indépendamment de la présence de métaux de transition (Pisoschi et Pop, 2015).

Tableau 5: Principales espèces réactives d'oxygène (ERO) (Di Meo et al., 2016).

| Espèces réactifs | nomenclature | symbole |
|--------------------------|------------------------------------|-----------------------------|
| Espèces radicalaires | Anion superoxyde | $O_2^{\cdot-}$ |
| | Radical hydroxyle | OH^{\cdot} |
| | Monoxyde d'azote / dioxyde d'azote | $NO^{\cdot} / NO_2^{\cdot}$ |
| | Radicaux peroxy | ROO^{\cdot} |
| Espèces non radicalaires | Peroxyde d'hydrogène | H_2O_2 |
| | Acide hypochlorique | $HOCl$ |
| | Peroxyde d'azote | $ONOO$ |
| | L'oxygène singulet | 1O_2 |

III.1.3. Sources des ERO

Les radicaux libres sont générés lors de processus aérobies tels que la respiration cellulaire, l'exposition à des infections microbiennes impliquant l'activation des phagocytes, lors d'une activité physique intensive ou l'action de polluants/toxines tels que la fumée de cigarette, l'alcool, les radiations ionisantes et UV, les pesticides et l'ozone. Les espèces oxygénées réactives en faible quantité représentent des molécules de signalisation, qui sont impliquées dans la régulation de la prolifération cellulaire, de l'apoptose et de l'expression des gènes en déclenchant des facteurs de transcription. Leur génération par les phagocytes est essentielle à la défense contre diverses souches de bactéries ou de champignons (Poljsak et al., 2013).

III.1.3.1. Sources endogènes des ERO

Il existe de nombreux systèmes à l'intérieur d'une cellule qui peuvent générer des ERO, ils sont résumés dans la figure 4. Les mitochondries sont reconnues comme le principal site de la production des ERO (Lenaz, 2012) et les deux complexes I et III ont été établis pour être les

sites spécifiques de génération des ERO mitochondriaux (Dröse et Brandt, 2012). Outre les mitochondries, de nombreuses enzymes sont également capables de la production de ROS. Il s'agit notamment du NADPH oxydase (NOX) qui joue un rôle essentiel dans la production de ERO, elle catalyse la conversion de l'oxygène en superoxyde (Muzza et Fugazzola, 2017). Les NADPH oxydases comprennent une famille de protéines capables de transférer des électrons du NADPH à travers les membranes cellulaires ; les électrons réagissent avec l'O₂ en générant de l'O₂^{•-} et d'autres ERO en cascade (Hansen et *al.*, 2018). Plusieurs fonctions physiologiques ont été liées à la génération de ERO par la famille des NADPH oxydases, notamment la signalisation cellulaire, la défense de l'hôte, le contrôle de la ventilation, la relaxation des muscles lisses, le contrôle de la production d'érythropoïétine et d'autres fonctions inductibles par l'hypoxie (Holmström et Finkel, 2014).

La xanthine oxydase (XO) catalyse l'hydroxylation oxydative de l'hypoxanthine en xanthine puis la xanthine en acide urique en produisant l'anion superoxyde (Chan, 2003). La XO joue un rôle crucial dans la génération de l'O₂^{•-} et du H₂O₂. L'O₂^{•-} produit au cours de l'ischémie-reperfusion est rapidement converti en ONOO⁻ par son interaction avec le NO (Rahman et *al.*, 2006).

L'oxyde nitrique synthases (NOS) est une famille d'enzymes qui convertissent l'acide aminé L-arginine en L-citrulline et en NO. La famille de NOS contient trois isoformes qui sont régulées par des gènes distincts : un NOS neuronal constitutif (NOS I), il joue un rôle important dans la communication intracellulaire, un NOS inductible par les endotoxines et les cytokines (NOS II), il utilise le NO pour induire le stress oxydatif sur les agents pathogènes et une NOS endothéliale constitutive (NOS III), il joue un rôle majeur dans la régulation de la fonction vasculaire (Toro et Rodrigo, 2009 ; Lee et *al.*, 2016).

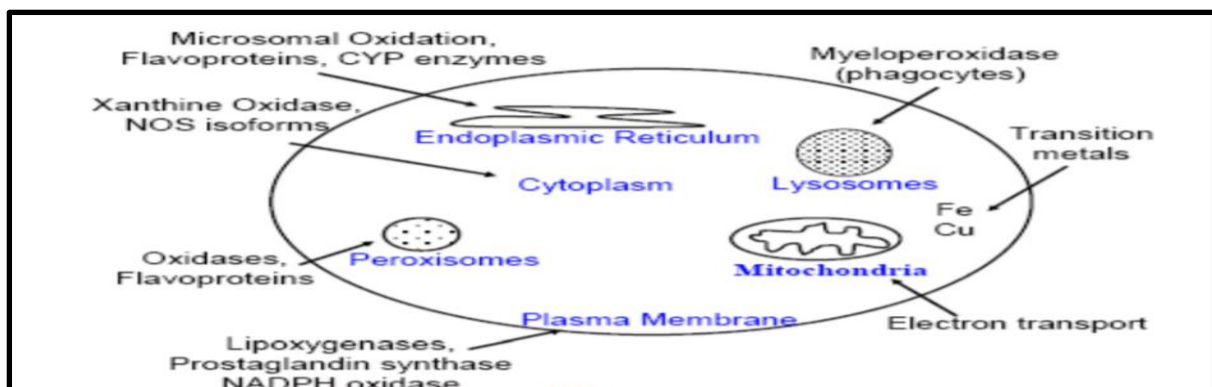


Figure 4: Sources endogènes des ERO (Mercan, 2010).

III.1.4. Causes

Les espèces réactives de l'oxygène peuvent être produites par une multitude de processus exogènes. Les agents environnementaux la pollution de l'air, ce dernier contient de la phase gazeuse, des particules, de l'ozone, de l'oxyde d'azote, du carbone le monoxyde et le dioxyde de soufre. Les particules présent dans l'air peuvent pénétrer profondément dans les voies respiratoires et peuvent provoquer une cytotoxicité en induisant un stress oxydatif, qui peut conduire à des dommages oxydatifs de l'ADN, la mutagenèse et la stimulation des facteurs pro-inflammatoires. En plus de l'oxydation (due aux radicaux libres de l'oxygène), la pollution de l'air peut également produire un stress nitrosatif (stress causée par des espèces d'azote réactif telles que l'oxyde nitreux) (Oh et *al.*, 2011).

D'autre part, la phase vapeur et les particules de la fumée de cigarette contiennent des radicaux libres, notamment des espèces réactives de l'oxygène, des espèces réactives de l'azote, du superoxyde, de radical hydroxyle, de l'oxyde nitrique et du peroxyde d'hydrogène. Ces composés peuvent pénétrer dans le flux sanguin et générer des ERO, notamment par interaction avec des enzymes telles que la NADPH oxydase, puis le résultat augmentaion du stress oxydatif (Tostes et *al.*, 2008).

L'induction d'un stress oxydatif et de dommages a été observée à la suite d'une exposition à divers xénobiotiques. Il s'agit de composés chlorés, d'ions métalliques tels que le fer, le cuivre, le cadmium, le mercure, peuvent induire la génération des radicaux réactifs et causent des dommages cellulaires par l'épuisement des activités enzymatiques par la peroxydation des lipides et la réaction avec les protéines nucléaires et l'ADN (Birben et *al.*, 2012).

Les rayonnements ionisants tels que les rayons UV, X ou gamma ont produit des radicaux hydroxyles, des superoxydes et les radicaux organiques (Gaston, 2016). Les radicaux libres, en particulier les ERO, peuvent être générés par le rayonnement UV qui peut endommager l'ADN (Burke et Wei, 2009 ; Pfeifer et Besarantinia, 2012).

III.1.5. Rôles biologiques des ERO

Les ERO et ERN sont à la fois nocifs et bénéfiques dans les systèmes biologiques, et même vitaux pour les organismes vivants (Valko et *al.*, 2007). Il y a de plus en plus de preuves indiquent que des concentrations faibles à modérées de ERO sont essentielles pour réguler les processus cellulaires. Ils sont impliqués dans les fonctions des canaux /

transporteurs ioniques (Kuallyov et Muallem, 2016), la génération d'étincelles de Ca^{2+} (Görlach et *al.*, 2016) et l'activation des protéines kinases / phosphatases (comme les protéines kinases) activée par le mitogène et les voies de kinases régulées par le signal extracellulaire qui modifient l'expression des gènes, ainsi qu'en coordination avec la SOD qui déclenche la mort cellulaire (Son et *al.*, 2011).

Les ERO sont également impliqués dans la régulation de la transcription génique, la transduction du signal et d'autres activités dans les cellules (Zhang et *al.*, 2016). De plus, les ROS constituent une partie importante du mécanisme de défense antibactérien incorporé par des macrophages et des neutrophiles (Slauch, 2011).

D'autre part, les ERN produits par les neurones agissent comme un neurotransmetteur, et ces espèces produites par les phagocytes (monocytes, macrophages et neutrophiles) agissent comme un milieu d'immunité. Ceux-ci sont également responsables de la régulation de l'adhésion leucocytaire, de la thrombose, de l'angiogenèse, du tonus vasculaire et de l'activité enzymatique (Madamanchi et Runge, 2013).

III.1.6. Pathologies liées au stress oxydatif

Il a été confirmé que les dommages induits par les radicaux libres dans le stress oxydatif contribuent à la pathogenèse et à la physiopathologie de nombreux problèmes de santé chroniques tels que les affections neuro-dégénératives (maladie de Parkinson, d'Alzheimer, de Huntington et sclérose latérale amyotrophique), l'emphysème, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires, la cataracte et le cancer (López-Alarcón et Denicola, 2013 ; Toda, 2011). Il a été évalué que le stress oxydatif est corrélé avec plus de 100 maladies, soit comme source soit comme résultat (Pisoschi et Pop, 2015). Une progression irréversible de la dégradation oxydative causée par des espèces réactives de l'oxygène exerce également son influence négative sur l'état de la biologie du vieillissement, consistant en une altération des fonctions physiologiques, favorisant l'incidence des maladies et réduisant la durée de vie (Maulik et *al.*, 2013).

➤ Stress oxydatif et cancer

Il a été évalué que les cellules cancéreuses sont caractérisées par des quantités plus élevées d'espèces réactives oxygénées que les cellules saines, et il a été prouvé que les ERO sont responsables du maintien du phénotype du cancer (Yousri et *al.*, 2011).

Dans le foie, il a été estimé que le réticulum endoplasmique et les peroxysomes ont une plus grande capacité à générer des ERO que les mitochondries (Brown et Borutaite, 2012), et que l'inflammation se produit lorsque les nitrosothiols présentent des groupes thiol libres, qui deviennent réversibles en raison de l'activité de la glutathion-transférase (Diesen et Kuo, 2010). Une série d'intermédiaires dotés d'une réactivité élevée et formés par des oxydes d'azote peuvent provoquer la nécrose des cellules hépatiques, l'inhibition de la fonction mitochondriale et la déplétion des nucléotides pyridines, entraînant la dégradation de l'ADN. L'oxyde nitrique et le peroxyde d'azote peuvent interagir, ce qui entraîne la formation de peroxyde d'hydrogène qui déclenche l'inhibition de la respiration mitochondriale, de la fonction de pompe T de Na⁺/K⁺ et de la phosphorylation des kinases (Diesen et Kuo, 2011). L'augmentation de la production d'espèces azotées réactives entraîne des réactions de nitrosylation, qui altèrent et perturbent la fonction des protéines (Klatt et Lamas, 2000). Les peroxydes peuvent également résulter de l'oxydation des aldéhydes, ce qui entraîne l'inflammation et la fibrose des organes (Stehbens, 2004).

Les niveaux élevés de marqueurs du stress oxydatif dans le cancer du sein ont été attribués à la fois au processus de la maladie et aux lésions tissulaires (Kasapović et al., 2010; Abdel-Salam et al., 2011). Les lésions tissulaires favorisent l'apparition d'espèces réactives de l'oxygène à la suite de l'activation des phagocytes ou de la libération d'ions de métaux de transition par les cellules touchées, qui se sont révélées capables d'aggraver encore la lésion (Aruoma, 1998).

➤ **Stress oxydatif et maladies cardiovasculaires**

Il a été confirmé que l'oxydation joue un rôle dans la pathogenèse de l'athérosclérose (Meagher et Rader, 2001). Les processus d'oxydation peuvent entraîner l'oxydation des lipides avec un effet pro-inflammatoire (Witztum et Berliner, 1998). De plus, les lipides autres que les LDL et les lipoprotéines présents dans la paroi des vaisseaux sanguins conduisent à l'inflammation et l'athérosclérose (Berliner et Navab, 1995).

Des études épidémiologiques indiquent qu'un apport accru en vitamines antioxydantes telles que la vitamine E, la vitamine C et le bêta-carotène peut entraîner une diminution du risque de maladie vasculaire athérosclérotique (Rimm et Stampfer, 2000).

Les NADPH oxydases vasculaires de la classe des hétéroooligomères ont été identifiées comme capables d'initier constamment la génération de ERO (Manea, 2010; 2012), il a été

établi que l'expression et l'activité des NOX sont régulées à la hausse dans le système vasculaire des sujets hypertendus et sont liées au développement de maladies macro et micro-vasculaires (Montezano et Touyz, 2012).

Les enzymes appartenant à la classe des NOX étant des amplificateurs du stress oxydatif, elles se sont avérées jouer un rôle majeur dans la pathologie vasculaires induites par le diabète (Fearon et Faux, 2009). Le N-acétylcystéine, les acides gras polyinsaturés et les vitamines antioxydantes se sont révélés capables de contenir le stress oxydatif cardiaque et de réduire les arythmies cardiaques (Rasoli et *al.*, 2011).

➤ **Stress oxydatif et maladies neurodégénératives**

L'épuisement des phospholipides membranaires, principal résultat de la lipoperoxydation, s'est distingué comme une cause majeure de maladies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer (Feng et Wang, 2012). L'apparition de peroxydes lipidiques et la diminution des activités enzymatiques antioxydantes se sont révélées étroitement liées à la formation de plaques séniles et d'enchevêtrements neurofibrillaires dans les cerveaux atteints de la maladie d'Alzheimer. La carbonylation des protéines, également due à la dégradation induite par le stress oxydatif, a été observé dans les cortex frontal et pariétal et dans l'hippocampe du cerveau atteint de la maladie d'Alzheimer, mais n'a pas affecté le cervelet (Hensley et *al.*, 1996).

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative et le deuxième stress oxydatif qui implique une perte progressive des neurones dopaminergiques dans la substantia nigra et l'agglutination des α -synucléines (Gandhi et Abramov, 2012). Dans la maladie de Parkinson, la concentration d'acides gras libres polyinsaturés dans la substantia nigra est réduite, avec une augmentation parallèle des marqueurs de peroxydation des lipides (Dalfó et *al.*, 2005). Les carbonyles protéiques, résultant du dommage oxydatif des protéines (Beal, 2002), sont également présents dans le cerveau des personnes atteintes de la maladie de Parkinson. La nitration et la nitrosylation des protéines résultant de l'action d'espèces réactives azotées dans le cerveau atteint de la maladie de Parkinson ont également été confirmées (Brown et Borutaite, 2004). Des niveaux élevés de 8-hydroxydéoxyguanosine (Seet et *al.*, 2010), associés à une augmentation des délétions courantes dans l'ADN mitochondrial des neurones dopaminergiques non affectés dans la substantia nigra, ont également été observés (Bender et *al.*, 2006).

➤ **Stress oxydatif et diabète**

Dans des conditions de stress oxydatif accru, les dommages cellulaires peuvent affecter la fonction des cellules β du pancréas, qui étant donné l'expression altérée des enzymes antioxydantes, est exceptionnellement sensible aux espèces réactives d'oxygène et d'azote (Bandeira et al., 2012; Valko et al., 2007). Les espèces réactives oxygénées sont capables d'interagir avec les substrats impliqués dans la signalisation intracellulaire de l'insuline (Evans et al., 2005). La forte charge énergétique des cellules, résultant principalement des quantités élevées de sucre (glucose), augmente le flux de coenzymes réduites (NADH et FADH₂) dans la chaîne de transport des électrons mitochondriaux. Lorsque le gradient de tension à travers la membrane mitochondriale atteint un seuil critique bloquant le complexe III, il permet la réduction de la coenzyme Q par les électrons. Le CoQH₂ peut ensuite réduire l'oxygène moléculaire, générant finalement un anion radical superoxyde (Brownlee, 2005). Il s'agit de la voie couramment suivie dans les complications du diabète sucré de type 2 impliquant un flux accru dans les voies des polyols et des hexosamines (Bandeira et al., 2012).

➤ **Stress oxydatif et maladies inflammatoires**

La corrélation entre l'inflammation chronique et le stress oxydatif est déjà confirmée : le déséquilibre entre l'activité de l'espèce oxydante, promoteur des agressions oxydatives, et la défense antioxydante, est impliqué dans l'asthme et la rhinite allergique (Sequeira et al., 2012, Ercan et al., 2006). La présence accrue de radicaux hydroxyles, d'anions de radicaux superoxydes et de peroxydes, peut entraîner une série d'altérations des muqueuses nasales et des voies respiratoires : peroxydation des lipides, réactivité marquée des voies respiratoires, sensibilité et sécrétions des muqueuses nasales et de haute perméabilité vasculaire (Sequeira et al., 2012).

En gros, les espèces réactives et les antioxydants influencent le système immunitaire. Le stress oxydatif perturbe la signalisation cellulaire et entrave le métabolisme de l'acide arachidonique, il renforce l'inflammation des voies du système respiratoires (Moreno-Macias et Romieu, 2014).

Le métabolisme de l'oxygène et l'augmentation de la production des ERO causant des lésions tissulaires, et associés à l'inflammation, jouent un rôle important dans la pathogenèse de la polyarthrite rhumatoïde (Mirshafiey et Mohsenzadegan, 2008).

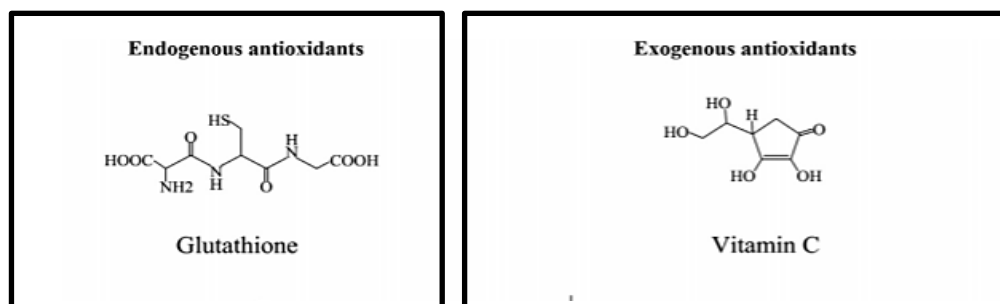
III.2. Antioxydants

III.2.1. Définitions et classifications

Le concept d'antioxydant biologique fait référence à tout composé qui, lorsqu'il est présent à une concentration inférieure à celle d'un substrat oxydable, est capable de retarder ou d'empêcher l'oxydation du substrat (Halliwell et Gutteridge 2015; Godic et *al.*, 2014). Les fonctions antioxydantes impliquent la réduction du stress oxydatif, des mutations de l'ADN, des transformations malignes, ainsi que d'autres paramètres des dommages cellulaires. Des études épidémiologiques ont prouvé la capacité des antioxydants à contenir les effets de l'activité des espèces réactives de l'oxygène, et à diminuer l'incidence du cancer et d'autres maladies dégénératives. Néanmoins, principalement en cas d'action soutenue des radicaux libres, la capacité du système de défense contre les ERO peut être dépassée, entraînant l'apparition de maladies (Godic et *al.*, 2014).

Il a été affirmé que, dans des conditions physiologiques, l'équilibre entre les composés prooxydants et antioxydants favorise modérément les prooxydants, engendrant ainsi un léger stress oxydatif, nécessitant l'intervention des systèmes antioxydants endogènes de l'organisme (Droge, 2002).

L'homéostasie redox de la cellule est assurée par son système de défense antioxydant endogène, qui comprend des antioxydantes enzymatiques comme la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase, et des composés non enzymatiques comme le glutathion, des protéines (bilirubine), l'acide urique, la coenzyme Q et l'acide lipoïque (Figure 7) (Poljsak et *al.*, 2013). Les antioxydants tels que les vitamines C et E, les caroténoïdes et les phénols (stilbènes, acides phénoliques, flavonoïdes et anthocyanidines), sont actuellement considérés comme les principaux antioxydants exogènes (Figure 5).



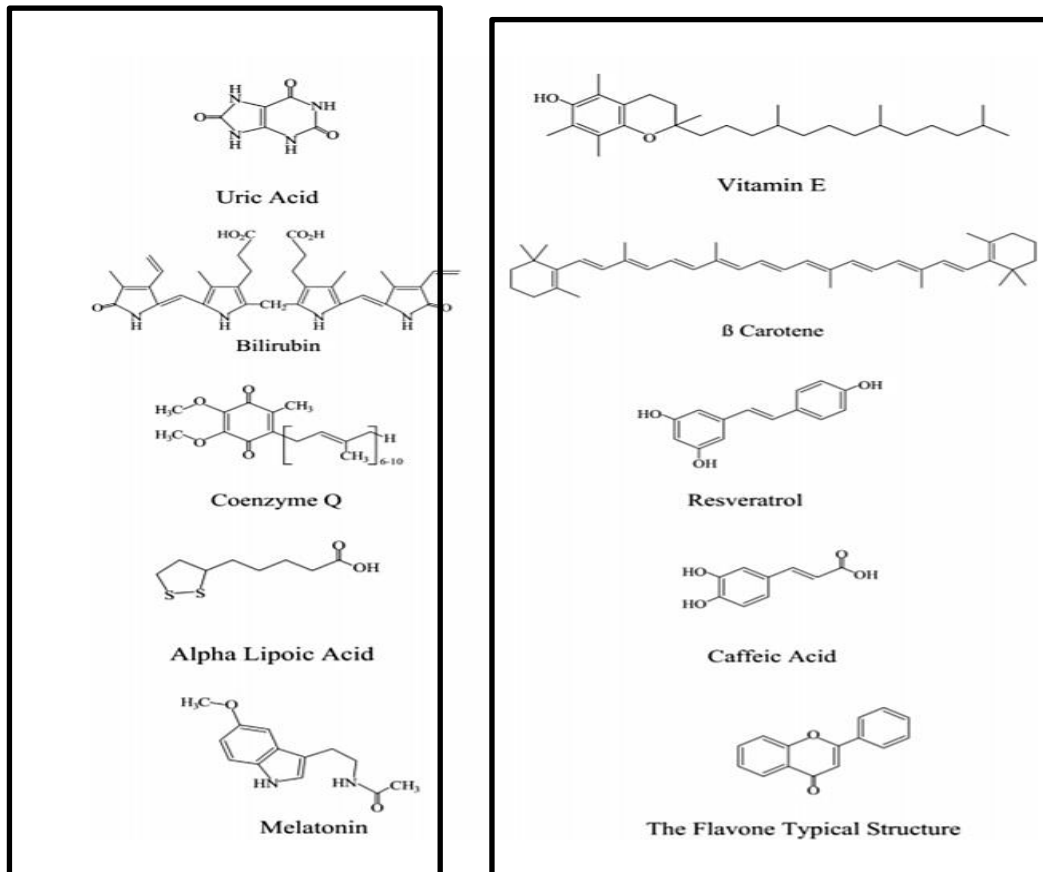


Figure 5: Différentes structures des principaux antioxydants endogènes et exogènes (Pisoschi et Pop, 2015).

III.2.2. Antioxydants enzymatiques

III.2.2.1. Superoxyde dismutase (SOD)

Les superoxydes dismutases sont considérés comme la première ligne de défense contre la décomposition oxydative, en transformant l'anion radical superoxyde $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 et O_2 . La SOD offre une protection contre les dommages cellulaires et histologiques induits par les ERO. Elle réagit très rapidement avec le NO, réduisant ainsi la bioactivité du NO et produisant l'ONOO- (Fukai et Ushio-Fukai, 2011).

Trois types de superoxyde dismutases peuvent être rencontrés dans les tissus des mammifères: la superoxyde dismutase contenant du cuivre et du zinc (SOD1), elle est dans le cytosol, le superoxyde dismutase contenant du manganèse (SOD2), elle est dans la matrice mitochondriale et le superoxyde dismutase extracellulaire (SOD3). Toutes trois sont fortement exprimées, principalement dans les tubules rénaux (Sung et *al.*, 2013, Ghezzi et *al.*, 2005). Une étude récente a prouvé que la SOD1 est une enzyme antioxydante majeure dans le contrôle du stress oxydatif en cas de lésion rénale (Gongora et *al.*, 2008).

III.2.2.2. Catalase (CAT)

La catalase représente l'enzyme impliquée dans l'appauvrissement réducteur de H_2O_2 en eau. Elle est exprimée dans la majorité des cellules, organes et tissus et à des concentrations élevées, dans le foie et les érythrocytes (Sung et *al.*, 2013).

Elle maintient la concentration physiologique de H_2O_2 , elle convertit l' H_2O_2 de manière catalytique en H_2O et O_2 et le neutralise ainsi (Asmat et *al.*, 2016). La CAT exerce son activité peroxydase *in vivo*. Elle peut également catalyser la réaction d'oxydation, par H_2O_2 de nombreux métabolites et toxines. Sa fonction de base est d'éliminer l' H_2O_2 et le peroxyde ROOH dans l'oxygène moléculaire afin de prévenir des dommages irréversibles aux membranes (Kıvrak et *al.*, 2017).

III.2.2.3. Glutathione peroxydase (GPx)

La glutathion peroxydase, une enzyme contenant du sélénium, catalyse à la fois la réduction de H_2O_2 et des hydroperoxydes organiques en eau ou en alcools correspondants. En utilisant généralement le glutathion (GSH) comme réducteur. La présence de sélénium comme fraction catalytique a été suggérée pour garantir une réaction rapide avec l'hydroperoxyde et une réductibilité rapide par le GSH (Brigelius-Flohé et Maiorino, 2013).

III.2.3. Antioxydants non enzymatiques

III.2.3.1. Glutathione (GSH)

Le GSH, un tripeptide (γ -L-glutamyl-L-cystéinyglycine), est un antioxydant endogène et un important agent de défense cellulaire contre les dommages oxydatifs. Dans des conditions physiologiques normales, le GSH est principalement réduit. Cependant, dans des conditions pathologiques, le rapport GSH/GSSG peut diminuer de manière significative. La voie du pentose phosphate régule le rapport GSH/GSSG en fournissant le NADPH qui est nécessaire à la réduction du GSSG en GSH par la GSH réductase (Aquilano et *al.*, 2014). Le GSH peut capter directement les ERO tels que H_2O_2 et $OH\cdot$ Ou indirectement par la réaction catalysée par le GPx (Kıvrak et *al.*, 2017). Le GSH peut régénérer d'autres antioxydants tels que la vitamine C et la vitamine E en leurs formes actives (Lü et *al.*, 2010). Il a un rôle dans la protection des lipides, des protéines et des acides nucléiques contre l'oxydation. Il agit comme cosubstrat d'enzymes antioxydants (glutathion peroxydase, glutathion réductase et transférase) (Lü et *al.*, 2010).

III.2.3.2. Acide urique

L'acide urique a prouvé sa capacité à éliminer les radicaux réactifs résultant de processus délétères, tels que l'auto-oxydation de l'hémoglobine, ou la génération de peroxyde par les macrophages (Sautin et Johnson, 2008). Des études portant sur son rôle dans l'encéphalomyélite allergique expérimentale ont rapporté la capacité de l'acide urique à bloquer à la fois la nitrosylation des protéines neuronales par les peroxy-nitrites et l'augmentation de la barrière hémato-encéphalique, avec moins d'infiltration de leucocytes (Hooper et *al.*, 1998). Des rapports scientifiques indiquent que l'environnement hydrophobe des milieux lipidiques peut influencer de manière négative sur l'action antioxydante de l'acide urique (Muraoka et Miura, 2003). Les lipides oxydés sont capables de transformer l'acide urique en un oxydant (Bagnati et *al.*, 1999). Les ions de cuivre et les hydroperoxydes de lipides sont capables d'augmenter le potentiel oxydant de l'acide urique par rapport aux lipoprotéines de faible densité, selon un mécanisme qui n'a pas été complètement élucidé (Bagnati et *al.*, 1999).

III.2.3.3. Bilirubine

C'est un Piégeur des H_2O_2 , $1O_2$ et $OH\bullet$, protégeant ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (Lyn Patrick, 2006). La bilirubine présente une activité cytoprotectrice efficace (Gongora et *al.*, 2008 ; Rigato et *al.*, 2005).

Il a été confirmé que la bilirubine lipophile empêche la peroxydation des lipides membranaires. Malgré des quantités faibles de bilirubine dans les tissus (Baranano et *al.*, 2002). Il a été confirmé sa capacité à réduire l'influence mutagène des espèces oxydantes, des hydrocarbures aromatiques polycycliques et des amines hétérocycliques (Bulmer et *al.*, 2008, Ohrui et *al.*, 2003).

III.2.3.4. Coenzyme Q (ubiquinone)

La coenzyme Q10 est un antioxydant liposoluble qui empêche la génération de radicaux libres et les modifications des protéines, des lipides et de l'ADN. Sa principale action biochimique est celle d'un cofacteur de la chaîne de transport des électrons dans la série de réactions d'oxydoréduction qui interviennent dans la synthèse de l'adénosine triphosphate (ATP) (Saini, 2011). Persson et *al.* (2012) ont observé que le traitement par la coenzyme Q10

prévient les altérations fonctionnelles et la morphologie des mitochondries, ainsi que l'hyperfiltration et la protéinurie.

Une étude a démontré que La coenzyme Q10 avait des effets renoprotecteurs en diminuant la teneur en lipides peroxydation ainsi que l'amélioration de la fonction rénale (Maheshwari et *al.*, 2014). Une autre fonction de cette enzyme, elle contribue à prolonger l'effet antioxydant de la vitamine E (Vašková et *al.*, 2012).

III.2.3.5. Vitamines

La vitamine C (acide ascorbique) est un antioxydant hydrosoluble qui prévient les dommages oxydatifs en éliminant les ERO et les ERN. De plus, elle a démontré des activités anti-apoptotiques par le maintien du potentiel de la membrane mitochondriale et par la protection de l'ADN mitochondrial contre les agressions des oxydants (Varma et *al.*, 2014, Chou et Tseng, 2017). La vitamine C joue des rôles essentiels dans le cerveau, notamment en tant que cofacteur de la dopamine bêta-hydroxylase, et participe donc à la biosynthèse des catécholamines. Elle protège également les phospholipides membranaires des dommages peroxydatifs et s'est révélée être un piège à radicaux libres efficace dans le cerveau (May, 2012).

La vitamine E est une vitamine liposoluble aux propriétés antioxydantes qui existe sous huit formes différentes : alpha, bêta, gamma et delta tocophérol ; et alpha, bêta, gamma et delta tocotriénol, l'alpha-tocophérol étant la forme la plus active chez les êtres humains (Farid et *al.*, 2013). Elle est capable de réagir avec les radicaux peroxydes pour former un radical tocophéryle (Mirończuk-Chodakowska et *al.*, 2017). C'est un puissant antioxydant de rupture de chaîne qui inhibe la production de ERO lorsque les graisses subissent une oxydation et lors de la propagation des réactions de radicaux libres. Elle agit comme première ligne de défense contre la peroxydation des lipides, protégeant les membranes cellulaires de l'attaque des radicaux libres (Rizvi et *al.*, 2014).

III.2.3.6. Caroténoïdes

La β -carotène piège les radicaux libres par son inhibition de la peroxydation des lipides induite par le système XO (Fiedor et Burda, 2014). Les caroténoïdes peuvent subir une réaction avec les radicaux libres selon trois mécanismes possibles : transfert des électrons, l'abstraction d'hydrogène et l'addition radicale (Young et Lowe, 2001).

Les caroténoïdes ont la capacité de neutraliser l'oxygène singulet et les ERO, de protéger contre la peroxydation induite par les UV et de réduire la formation de lipofuscine et les dommages associés induits par le stress oxydatif (Eggersdorfer et Wyss, 2018).

Des études scientifiques se sont concentrées sur un autre caroténoïde puissant, le lycopène, et sa présence dans le plasma et le sérum a été inversement associée au risque de cancer (Wakai et *al.*, 2005). Il a été constaté que l'activité antioxydante du lycopène est supérieure à celui du bêta-carotène et de l'alpha-tocophérol (Miller et *al.*, 1996).

III.2.3.7. Antioxydants phénoliques (Polyphénols)

Les polyphénols sont des composés organiques que l'on trouve en abondance dans les plantes, sont devenus un domaine d'intérêt émergent en nutrition au cours des dernières décennies. Un nombre croissant de recherches indique que la consommation de polyphénols peut jouer un rôle vital dans la santé grâce à la régulation du métabolisme, du poids, des maladies chroniques et de la prolifération cellulaire. Plus de 8000 polyphénols ont été identifiés jusqu'à présent, bien que leurs effets sur la santé à court et à long terme n'aient pas été entièrement caractérisés (Lecour et Lamont, 2011). Parmi les antioxydants phytochimiques on note, les flavonoïdes, les tanins, les coumarines, les substances phénoliques, les lignanes et les terpénoïdes qui sont présents dans divers produits végétaux (tels que les fruits, les feuilles, les graines et les huiles) (Jeong et *al.*, 2004).

Des supports scientifiques indiquent la consommation à long terme d'aliments riches en polyphénols protège contre certains cancers, les maladies cardiovasculaires, le diabète de type 2, l'ostéoporose, la pancréatite, les problèmes gastro-intestinaux, les lésions pulmonaires et les maladies neurodégénératives (Fraga et *al.*, 2010 ; Martin-Pelaez et *al.*, 2013 ; Fujiki et *al.*, 2015 ; Xiao et Hogger, 2015).

A. Acides phénoliques (acides hydroxybenzoïque et hydroxycinnamique)

Les acides phénoliques, connus pour servir de composés bioactifs polyvalents, sont largement répandus dans tout le règne végétal. La plupart d'entre eux font partie intégrante de l'alimentation humaine et sont également consommés sous forme de préparations médicinales. Bon nombre des effets protecteurs pour la santé des composés phénoliques ont été attribués à leurs propriétés antioxydantes, antimutagènes, anticarcinogènes, anti-inflammatoires, antimicrobiennes et autres (Xu et *al.*, 2008). Les dérivés substitués

des acides hydroxybenzoïque et hydroxycinnamique sont les acides phénoliques prédominants dans les plantes (Figure 6) (Shahidi et Ambigaipalan, 2015).

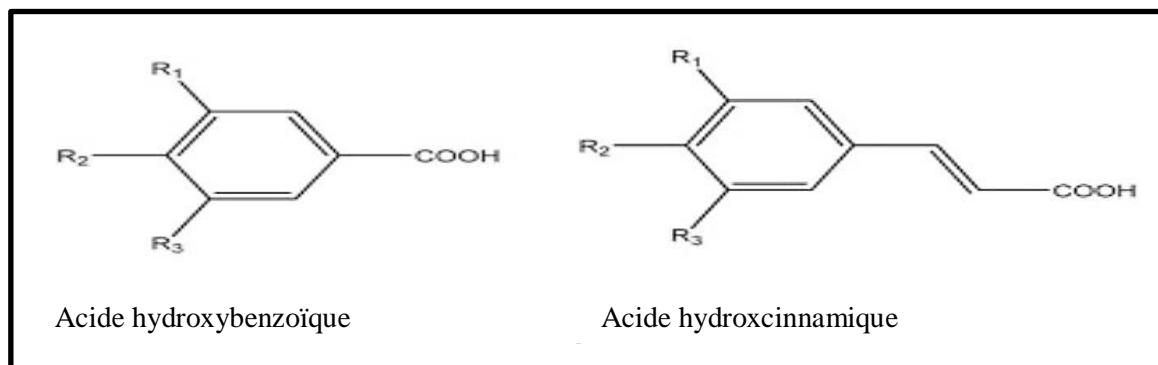


Figure 6: Structures chimiques des acides phénoliques naturels (Shahidi et Ambigaipalan, 2015).

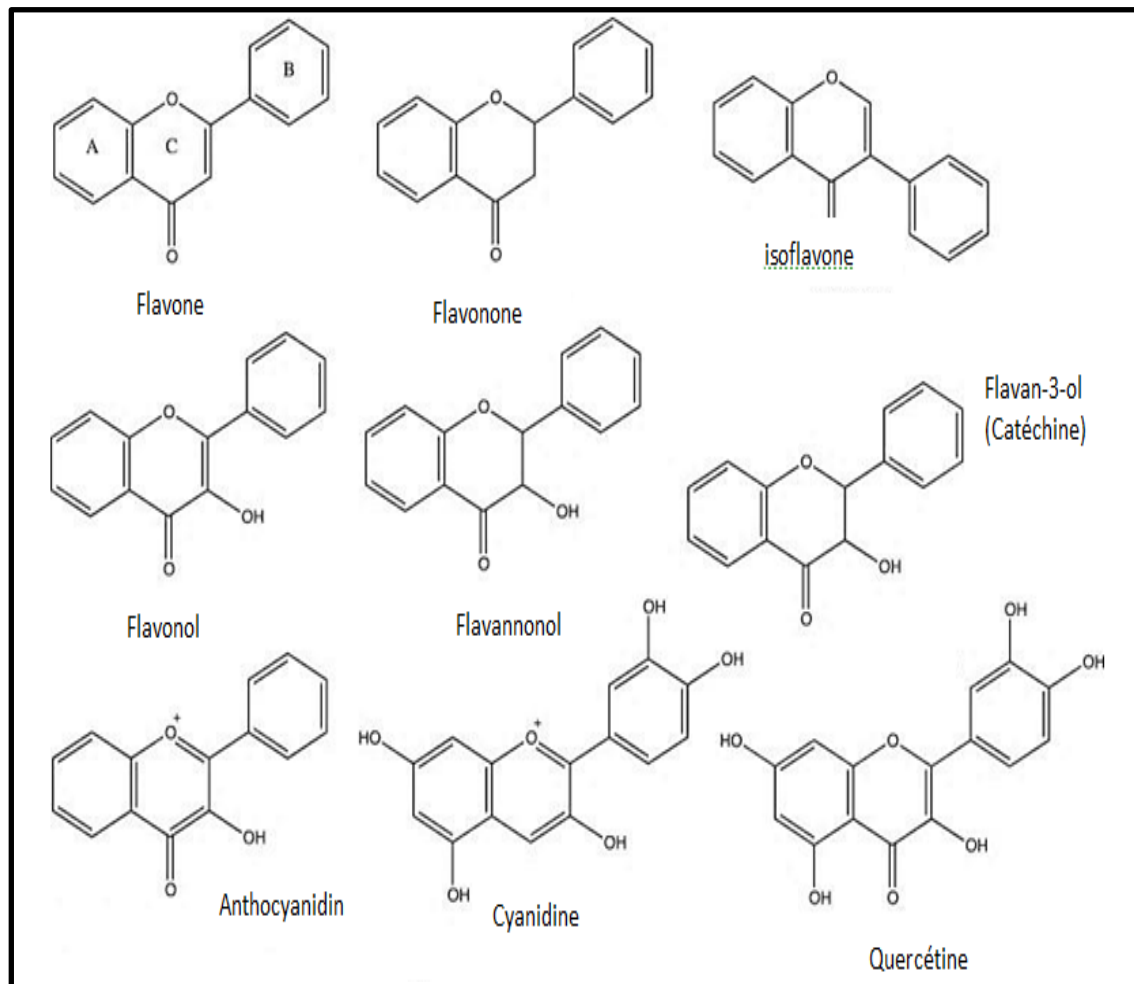
Les acides hydroxycinnamiques les plus courants sont l'acide caféique, *p*-coumarique et l'acide férulique, aussi l'acide chlorogénique, qui est composé (d'acides caféique et quinique). Les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque sont présents dans les aliments sous forme de glucosides, qui sont principalement les acides *p*-hydroxybenzoïque, vanillique et protocatéchique (Shahidi et Chandrasekara, 2010; Shahidi et al., 2008; Yeo et Shahidi, 2015).

L'acide caféique, l'un des acides cinnamiques naturels les plus importants, est connu pour bloquer sélectivement la biosynthèse des leucotriènes, composants impliqués dans les maladies d'immunorégulation, l'asthme et les réactions allergiques (Yasuko et al., 1984). D'autres études ont rapporté que l'acide caféique et certains de ses esters pourraient posséder une activité antitumorale contre la carcinogenèse du côlon (Olthof et al., 2001; Robbins, 2003).

B. Flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent le plus important groupe de polyphénols, avec plus de 6000 flavonoïdes ont été identifiés (Harborne et Williams, 2000) et qui peuvent être subdivisés en 13 classes (Figure 7) (Schroeter et al., 2002). Leur caractéristique structurelle commune est la fraction diphenylpropane, qui consiste en deux cycles aromatiques liés par trois atomes de carbone, l'ensemble formant généralement un hétérocycle oxygéné. L'intérêt récent pour les composés phénoliques en général, et les flavonoïdes en particulier, a fortement augmenté en raison de leur capacité antioxydante par le mécanisme de piéger les radicaux libres, y compris

les radicaux hydroxyle, peroxy et superoxyde et peuvent former des complexes avec des ions métalliques catalytiques les rendant inactifs et de leurs possibles implications bénéfiques pour la santé humaine (Schroeter et *al.*, 2002). Celles-ci comprennent le traitement et la prévention du cancer, des maladies cardiovasculaires et d'autres troubles pathologiques (Rice-Evans, 2001). Les membres de la famille immédiate des flavonoïdes comprennent: Flavones (Chrysin, Apigénine), isoflavones (la génistéine, la daidzéine et la glycitéine), flavanols (catéchines), flavonols sont principalement représentés par (la quercétine, le kaempférol, la myricétine et la rutine), flavanones, (Naringin, Naringénine, Taxifoline, Eriodictyol, Hespéridine), anthocyanines (le cyanidin-3-glucoside) et anthocyanidines (Épigénidine, Cyanidine, Delphinium, Pélargonidine) (Losada-Barreiro et Bravo-Díaz, 2017).



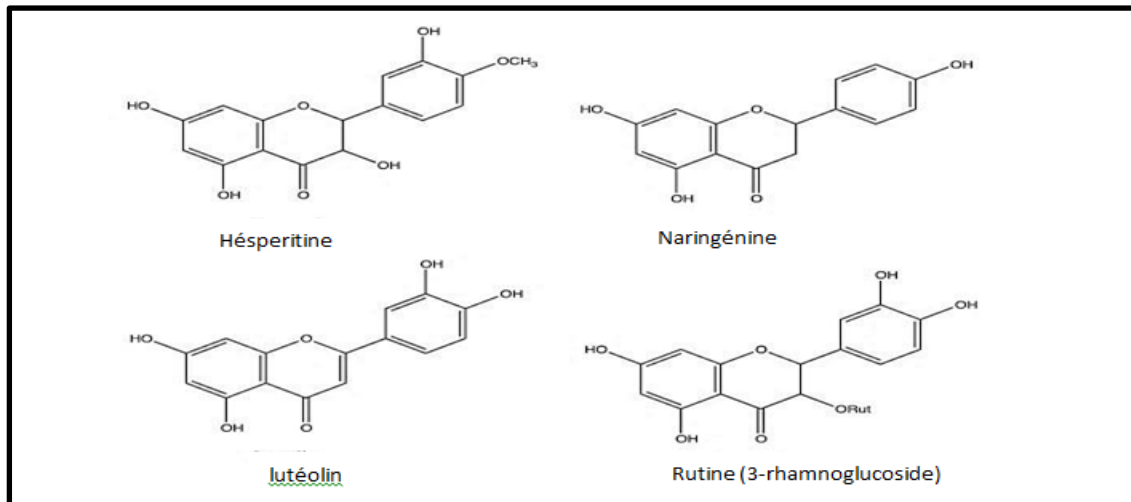


Figure 7: Structures chimiques des principales classes de flavonoïdes et de certains composés apparentés aux flavonoïdes (Shahidi et Ambigaipalan, 2015).

C. Tanins

Les tanins sont définis comme hydrolysables ou condensés (proanthocyanidines), selon leurs structures chimiques (Shahidi et Naczki, 2004). Les tanins condensés sont des oligomères et des polymères de flavonoïdes, en particulier des flavan-3-ols, tandis que les tanins hydrolysables sont de l'acide gallique glycosylé (Ferreira et Li, 2000 ; Khanbabaee et Ree, 2001).

Les tanins sont connus pour inhiber la peroxydation lipidique et les lipoxygénases *in vitro*, et sont capables de piéger les radicaux tels que l'hydroxyle, le superoxyde et le peroxyde, qui sont connus pour être importants dans l'état de prooxydation cellulaire (Gyamfi et Aniya, 2002). Scalbert (1991) a rapporté que les tanins semblent affecter la croissance bactérienne par l'inhibition de la phosphorylation oxydative. Amarowicz et Pegg (2013) ont rapporté des activités antiprolifératives de manière concentration-dépendante de tanins hydrolysables contre cinq lignées cellulaires de carcinome. Plusieurs recherches ont montré que les tanins présentent des propriétés anti-inflammatoires, anti-fongiques, anti-tumorales, antivirale et antidiarrhéique (Maïga et al., 2005).

D. Stilbènes

Les stilbènes, en particulier le *trans*-resvératrol et son glucoside, sont bénéfiques pour la santé, ayant des propriétés antioxydantes, anticarcinogènes et antitumorales (Burns et al., 2002 ; Jung et al., 2009 ; Torres et al., 2010).

Trans-Resveratrol a attiré une attention mondiale significative en raison de sa capacité à inhiber ou retarder une grande variété de maladies animales, y compris les maladies cardiovasculaires et le cancer (Jaganath et Crozier, 2010). Gülçin (2010) a rapporté que le resvératrol est un antioxydant efficace dans différents tests *in vitro*, y compris l'activité antioxydante totale, le pouvoir réducteur, DPPH[•], ABTS^{•+}, DMPD^{•+} et O₂^{•-}, activités de piégeage du peroxyde d'hydrogène et de chélation des métaux, par rapport aux antioxydants standards (Gülçin, 2010). Le resvératrol peut également être utilisé pour minimiser ou prévenir l'oxydation des lipides dans les produits pharmaceutiques, retarder la formation de produits d'oxydation toxiques, maintenir la qualité nutritionnelle et prolonger la durée de conservation des produits pharmaceutiques (Shahidi et Ambigaipalan, 2015).

McCormack et McFadden (2012) ont rapporté que le ptérostilbène inhibe la croissance du cancer en altérant le cycle cellulaire, en induisant l'apoptose et en inhibant les métastases *in vitro*. En outre, il a été démontré que le ptérostilbène inhibe la production du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) dans les cellules du cancer du sein humain [MDA-MB-231] (Sanghani et al., 2013).

E. Lignanes

Les lignanes sont des substances phénoliques végétales naturelles, dérivées biosynthétiquement de phénylpropanoïdes, qui sont des composants importants des aliments et des médicaments (Cunha et al., 2012). Sur la base de leurs différentes chaînes ramifiées et des différents schémas de substitution, les lignanes peuvent être classés en : dibenzocyclooctadiène, arylnaphtalène, aryltétraline, dibenzylbutane, dibenzylbutyrolactol, dibenzylbutyrolactone, furofurane et furane (Zhang et al., 2014 ; Teponno et al., 2016).

Plus particulièrement, Les lignanes de furofuran, représentent l'une des principales sous-classes de la famille des lignanes, ils possèdent une grande variété de structures en raison des modèles de liaison, des différents substitués et des diverses configurations. Par conséquent, il a été signalé qu'ils présentent un large éventail d'activités biologiques, notamment des activités anti-oxydantes, anti-inflammatoires, cytotoxiques et anti-microbiennes (Xu et al., 2018).

IV. Généralités sur l'inflammation et les anti-inflammatoires

L'inflammation est généralement une réponse normale des tissus vivants à une blessure, une brûlure, une attaque microbienne, virale ou fongique ou un dysfonctionnement des cellules de l'organisme. À cet effet, ce dernier fait recours à des mécanismes de défense. En effet, les cellules de l'immunité qui sont en garde détectent automatiquement l'envahisseur et une série des réactions biochimiques est déclenchée pour empêcher l'agent agresseur de se propager en lançant une réparation. C'est l'inflammation ou réaction inflammatoire (Ibrahima, 2019).

L'inflammation peut être causée par des facteurs mécaniques (soit par la pression, soit par corps étrangers), chimiquement (toxines), physiquement (température), par des processus internes (urémie) et par des microorganismes (bactéries, virus, parasites). Le processus d'inflammation est sous le contrôle des mastocytes qui sont situés à proximité des nerfs autonomes. Ils sont généralement constitué de tissus conjonctifs avec des granules très volumineux qui contiennent principalement de la sérotonine, de l'héparine, de l'histamine et de la bradykinine qui ont été libérés des mastocytes en réponse à une blessure, une infection et par leur dégranulation. Ces constituants contrôlent presque tous les processus inflammatoires (Angajala et Radhakrishnan, 2014)

IV.1 Types d'inflammation

La compréhension de l'inflammation a augmenté énormément au cours des 20 dernières années. Inflammation peut être classée en deux catégories : les inflammations aiguës et chroniques.

IV.1.1. Inflammation aiguë

L'inflammation aiguë est un processus de courte durée qui dure généralement de quelques heures à plusieurs jours et qui cesse dès que les stimuli nuisibles sont éliminés. Les symptômes courants de l'inflammation aiguë sont la douleur, la rougeur, l'immobilité (perte de fonction), le gonflement et la chaleur au niveau macroscopique (Chua, 2014).

Elle comprend trois grandes phases; une phase vasculaire immédiate; une phase cellulaire consécutive et une phase de résolution et de cicatrisation (Stevens, 2010).

La phase vasculaire : Elle commence par une vasoconstriction de courte durée causée par l'action du système sympathique, elle est rapidement ressentie puisque douloureuse. Cette douleur s'explique par la libération d'histamine, de sérotonine, des prostaglandines et de kinine. L'excitabilité des terminaisons nerveuses en est la conséquence et va conforter le processus douloureux (Bony, 2010). La vasoconstriction est suivie d'une vasodilatation des vaisseaux, ce qui entraîne une augmentation de la viscosité et de l'élévation de la perméabilité vasculaire, facilitant ainsi l'afflux des cellules dans le foyer inflammatoire. La diapédèse s'ensuit, après l'adhérence des cellules à la paroi endothéliale des vaisseaux sanguins (Hajjaj, 2017).

La phase cellulaire : Correspond à l'arrivée au foyer inflammatoire des leucocytes. Elle débute avec les polynucléaires neutrophiles, qui sont remplacés progressivement par les cellules mononuclées, principalement les macrophages. La libération d'enzymes hydrolytiques des polynucléaires et le pouvoir phagocytaire des macrophages permettent la destruction de l'agent pathogène (Hajjaj, 2017).

La phase de résolution : C'est la phase de l'élimination du pathogène, des neutrophiles morts et des produits de la dégradation tissulaire, donc du retour à l'homéostasie. Les macrophages vont alors sécréter des cytokines (IL-4 et IL-10), des fibroblastes et des médiateurs qui vont induire la phase de cicatrisation et de régénération tissulaire douloureuses (Carip, 2010; Mebirouk, 2017).

V.1.2. Inflammation chronique

L'inflammation chronique correspond à la persistance de l'agent pathogène à cause de l'échec de la réponse inflammatoire aiguë ou d'une réponse inappropriée (Hajjaj, 2017). La balance entre les molécules pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8, et TNF α) et anti-inflammatoires (IL10, IL-4, IL-13 et TGF β) est perturbée, ce déséquilibre conduisant à des nombreuses pathologies tel que (le cancer, le diabète et l'athérosclérose) et aussi à la destruction des tissus enflammés (Mebirouk, 2017).

IV.2. Médiateurs inflammatoires

Le processus inflammatoire implique une diversité de molécules appelée médiateurs inflammatoires (Tableau 6). Parmi elles, on peut citer : les cytokines, l'oxyde nitrique, les médiateurs lipidiques et même des radicaux libres oxygénés.

Tableau 6: Médiateurs inflammatoires.

| Médiateurs | Origines | Effets biologiques |
|--|---|---|
| Histamine | Mastocytes, Basophiles, Plaquettes | Vasodilatation, augmentation de la perméabilité vasculaire, activation endothéliale et douleur (Ibrahima, 2019) |
| Sérotonine | Mastocytes et plaquettes. | Augmente la perméabilité vasculaire, dilate les capillaires et stimule la contraction des muscles lisses (Rankin, 2004; Male et <i>al.</i> , 2007). |
| Cytokines | Macrophages, Mastocytes et neutrophiles | (IL-1, IL-6) : Activation endothéliale, diapédèse IL-4, IL-10 : Inhibition de la production des cytokines pro-inflammatoires et leurs effets délétères (Ibrahima, 2019) |
| Tumor necrosis factor α (TNF α) | Macrophages et Mastocytes | Recrutement des globules blancs, diapédèse, effet microbicide et élimination de l'agent pathogène (Ibrahima, 2019) |
| Oxyde nitrique (NO) | Macrophages et Mastocytes | Effet cytotoxique sur l'agresseur et induction d'effet cytotoxique et relaxation des muscles (Ibrahima, 2019) |
| Prostaglandines, prostacylines et thromboxanes | Acide arachidonique | Vasodilatation, augmentation perméabilité vasculaire, douleur, fièvre, agrégation plaquettaire (Ibrahima, 2019) |
| 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 (Rankin, 2004; Male et <i>al.</i> , 2007). |

IV.3. Les anti-inflammatoires

Un anti-inflammatoire est défini comme étant une substance qui agit sur la douleur et le gonflement qui apparaissent suite à une agression d'un agent pathogène. Elle bloque la sécrétion ou l'action de certains médiateurs chimiques de l'inflammation (comme les prostaglandines) et donc diminue la sensation des douleurs mais aussi les inflammations (Hajjaj, 2017 ; Orliaguet et *al.*, 2013). Les anti-inflammatoires sont utilisées lorsque les réactions inflammatoires se prolonge de façon anormale (inflammation chronique) et entraînent des dommages aux tissus. Ces molécules sont classées en anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), anti-inflammatoires stéroïdiens (cortisone et dérivés) et anti-inflammatoires naturels.

IV.3.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

C'est l'une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires, antalgique, antipyrétique (contre la fièvre) et antiagrégant plaquettaire pour certains (Haioun et Zohra, 2015). C'est une catégorie de médicaments renfermant de nombreuses molécules telles que le diclofénac, l'ibuprofène, l'aspirine et l'indométacine (Erdogan et *al.*, 2019 ; Hassan et *al.*, 2019 ; Katsinelos et *al.*, 2019). Leur mode d'action repose en grande partie sur l'inhibition compétitive, réversible ou non, de la cyclooxygénase 1 et/ou 2, enzyme qui permet la production de prostaglandine à partir de l'acide arachidonique. Cette propriété commune à tous les AINS conduit à une diminution de 50 la production des prostaglandines (notamment la PGE2 et la PGI2), des prostacylines et des thromboxanes, importants médiateurs de l'inflammation (Grandin, 2013 ; Katsinelos et *al.*, 2019). Malheureusement, ils sont également associés à de nombreux effets délétères car leur utilisation prolongée provoque des troubles gastro-intestinaux (comme les saignements intestinaux) et le dysfonctionnement plaquettaire. D'autres effets secondaires comme l'hypertension associée au dysfonctionnement rénal ont été également mentionnés (Mebirouk, 2017 ; Capet et *al.*, 2001 ; Orliaguet et *al.*, 2013).

IV.3.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS)

Ils constituent une classe des médicaments qui sont des dérivés synthétiques de la cortisone (Coutinho et Chapman, 2011). Parmi eux, on peut citer : le méthylprednisolone, le bêtaméthasone, la prednisone et la prednisolone (Dworski et *al.*, 1994 ; Bourbon et *al.*, 2004 ;

Becker, 2013 ; Danielson et *al.*, 2018). Ce sont des puissants anti-inflammatoires très utilisés doués également de propriétés immuno-modulatrices et antiallergiques (Coutinho et Chapman, 2011). Parlant de leur mécanisme d'action, les glucocorticoïdes ont, à l'image des AINS, une action inhibitrice de la synthèse des prostaglandines qui s'exerce spécifiquement sur la phospholipase A2, au début du métabolisme de l'acide arachidonique. Ils ont une action à la fois cytoplasmique et génomique, ayant pour conséquences une modulation de la transcription et de l'expression des médiateurs (Dejean et Richard, 2013). Les glucocorticoïdes en se fixant donc sur le promoteur des gènes vont soit bloquer l'action des facteurs de transcription nucléaire qui jouent un rôle important dans le cadre de la réponse à l'agression tels que NF- κ B, soit stimuler la transcription des gènes (par exemple la lipocortine-1, thymosine ...etc). En bref, les glucocorticoïdes se fixent sur le promoteur des gènes des médiateurs pro-inflammatoires et bloquent leur action (Roquilly et Asehnoune, 2019).

Il est à noter que l'utilisation de ces corticostéroïdes a des inconvénients. Ils sont bien connus pour provoquer l'hyperglycémie, une sensibilité accrue aux infections et des troubles psychiatriques (Capet et *al.*, 2001 ; Mebirouk, 2017).

IV.3.3. Anti-inflammatoires morphiniques

Les composés phytochimiques issus du règne végétal sont très nombreux avec une gamme variée d'activités biologiques (Dhingra et *al.*, 2018). Parmi eux, certains possèdent une activité anti-inflammatoire et ont pour cibles particulières la COX-1 et -2, les lipoxgénases (LOX), le NO, la phospholipase A2 (PLA2), etc. Ces molécules présentent un intérêt crucial car elles offrent des avantages par rapport aux anti-inflammatoires classiques, avec moins d'effets secondaires (Maroon et *al.*, 2010 ; Mebirouk, 2017 ; Dhingra et *al.*, 2018).

On trouve parmi les molécules anti-inflammatoires d'origine naturelle, La curcumine isolée de *Curcuma Zongu* L. qui montre cliniquement une efficacité comparable à celle de la phénylbutazone. L'oléorésine de diverses espèces de *Copuiferu* L. (Fabaceae), la magnoshinine et la magnosaline, isolées des fleurs de *Magnolia salicifolia*, dont les essais pharmacologiques réalisés confirment l'utilisation des fleurs en médecine traditionnelle contre l'inflammation chronique des sinus (Ibrahima, 2019). Certains constituants de *Zingiber officinale*, ils sont largement utilisés en médecine asiatique et arabe pour traiter les

inflammations et les rhumatismes, par l'inhibition de la production du TNF- α (Tumor Necrosis Factor) en agissant sur l'expression des gènes (Setty et Sigal, 2005).

L'utilisation de plantes médicinales est devenue populaire en raison des effets secondaires des médicaments allopathiques. Les plantes médicinales jouent un rôle important dans le développement d'agents thérapeutiques puissants.

Aichour et ces collaborateurs (2018) ont signalés que le câprier possède un effet anti-inflammatoire, a également inhibé considérablement l'œdème de la pate induit par la carragénine. Du fait que, la plante est riche en polyphénols, flavonoïde, les alcaloïdes, stéroïdes et saponines.

Teucrium polium est également très utilisée pour le traitement des œdèmes. Son effet anti-inflammatoire revient à ces composés phénoliques tels que les flavonoïdes, l'acide phénolique et les tannins qui inhibent la synthèse de prostaglandines au niveau périphérique et la formation d'œdème (Krache et *al.*, 2018).

Une étude réalisée par Bouden et *al.* (2017) a démontré que l'activité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux de *Matricaria pubescens* présente une efficacité sur l'œdème aiguë et chronique de la patte des souris induit par le carragénine, et chez les rats induit par le collagène type II.

Zygophyllum gaetulum est largement utilisée en médecine traditionnelle pour des indications thérapeutiques très variées, comme les affections gastro-intestinales, hépatiques, antidiabétiques (Bellakhdar, 1997) et principalement comme une plante anti-inflammatoire (Ait El Cadi et *al.*, 2012).

Urtica dioica est une plante qui est utilisée dans la médecine traditionnelle pour le soulagement d'eczéma et les douleurs arthritiques (Lin et Karin., 2007)

Harpagophytum procumbens, est parmi les plantes issue de la médecine traditionnelle africaine, elle a diminué significativement l'œdème de la patte induit par le carragénine (Catelan et *al.*, 2006). L'activité anti-inflammatoire de cette plante est peut être due à sa capacité d'inhiber la synthèse des eicosanoïdes et la production du TNF- α par les monocytes humains ou à son pouvoir de réduire la production de la myelopéroxydase par les neutrophiles (Setty et Sigal, 2005).

Il existe d'autres plantes médicinales en Algérie qui possèdent des propriétés anti-inflammatoires, on cite : *Lavandula officinalis* (Pereira et al., 2018), *Mentha pulegium* L (Kumar et al., 2011 ; Ceker et al., 2013), *Artemisia campestris* L (Megdiche-Ksouri et al., 2015 ; Dib et al., 2017), *Juniperus oxycedrus* (Boudjelal et al., 2013 ; Dob et al., 2006).

V. Généralités sur la douleur et les antalgiques

V.1. Rappel sur la douleur

L'International Association for the Study of Pain (IASP) définit la douleur comme «une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, associée à des lésions tissulaires réelles ou potentielles, ou décrite dans ces termes» (Thombre et *al.*, 2019).

D'autre part les prostaglandines sont formées par une enzyme appelée cyclooxygénase 2 (COX-2), sécrétée par les cellules endommagées et qui induit la sensation de douleur en se connectant aux récepteurs liés aux protéines G et en augmentant la quantité d'AMPC dans les cellules. Comme la souffrance provoque un malaise mental, l'homme a toujours cherché un moyen d'éliminer ou de diminuer la douleur (Dehkordy et *al.*, 2017). De nos jours, utilisez des anti-inflammatoires non stéroïdiens pour contrôler la douleur. Leur action analgésique est produite rapidement mais leur effet secondaires est le principal inconvénient de leur utilisation. Ces médicaments provoquent un dysfonctionnement de système digestif, un prurit, une vision trouble, des étourdissements, des éruptions cutanées et des lésions hépatiques (Thombre et *al.*, 2019).

V.2. Types de la douleur

Il existe deux types de douleur :

- Douleur aiguë: elle est due à des dommages aux tissus, elle est de courte durée (moins de 6 mois) ou peut facilement identifier les causes de cette douleur. Ce dernier survient en raison de l'inflammation et l'inflammation est due à des lésions tissulaires ou nerveuses (dues à une chirurgie, un cancer, une infection, une fracture, un diabète et une chimiothérapie).
- Douleur chronique: est une douleur à long terme (plus de 6 mois), elle est permanente et généralement difficile à traiter et elle peut durer plus longtemps que la durée habituelle de guérison (Thombre et *al.*, 2019).

V.3. Sources des analgésiques

Les analgésiques sont utilisés pour soulager la douleur sans perte de conscience, par l'action sur le système nerveux central et/ou périphérique. Ils sont répartis en deux classes, les

analgésiques synthétiques (non morphiniques et morphiniques) (Aouissa, 2002) et les analgésiques naturels.

V.3.1. Analgésiques non morphiniques

Les médecins impliqués dans les soins périopératoires, ainsi que les soignants en douleur chronique, se tournent de plus en plus vers l'utilisation de médicaments analgésiques non opioïdes (White, 2006 ; Cao et *al.*, 2016). Les progrès récents dans la prise en charge pharmacologique de la douleur aiguë et chronique ne sont pas le résultat de nouveaux médicaments «miracles», mais souvent de nouvelles préparations et de nouvelles façons d'utiliser les «anciens médicaments» comme composants d'une approche multimodale du soulagement de la douleur (Schug et Goddard, 2014).

Il existe une gamme diversifiée de composés pharmacologiques non opioïdes utilisés pendant la période périopératoire, tels que l'adénosine, le dropéridol, le magnésium, la néostigmine et la gabapentine, auraient des propriétés anti-analgésiques (White, 2006).

La gabapentine (un analogue structurel de l'acide gamma-aminobutyrique) est un anticonvulsivant qui s'est avéré utile dans le traitement de la douleur neuropathique chronique et peut également être un adjuvant utile dans la prise en charge de la douleur postopératoire aiguë (Dirks et *al.*, 2002 ; Dahl et *al.*, 2004).

Le magnésium, un cation bivalent, aurait également des effets antinociceptifs. Selon Kara et *al.* Le magnésium entraînait une réduction significative des besoins analgésiques postopératoires après une hystérectomie abdominale (White, 2005).

Des recherches ont signalé que la néostigmine, un inhibiteur de la cholinestérase, possédait des propriétés analgésiques lorsque il a été administré dans les espaces sous-arachnoïdiens ou épiduraux (Lauretti et *al.*, 1999 ; Tan et *al.*, 2000).

V.3.2. Analgésiques morphiniques (opioïdes)

Ils sont connus pour leurs propriétés analgésiques, les opioïdes ciblent les récepteurs exprimés tout au long de la voie de la douleur afférente, y compris les terminaisons nerveuses périphériques des neurones afférents primaires (Corder et *al.*, 2013 ; Leduc-Pessahet *al.*, 2017).

Les médicaments et les opioïdes d'origine endogène, β -endorphine, les enképhalines et les dynorphines, exercent un contrôle inhibiteur efficace de la douleur à la fois au niveau de la colonne vertébrale (Corder et *al.*, 2013 ; Ossipov et *al.*, 2010) et des sites périphériques après l'inflammation (Baddack-Werncke et *al.*, 2017 ; Verma-Gandhu et *al.*, 2006). Sur les sites inflammatoires, des opioïdes dérivés du système immunitaire sont libérés pour contrer efficacement la douleur et faciliter la guérison. De plus, une altération du système opioïde endogène dans la moelle épinière a été proposée pour empêcher la transition d'une douleur inflammatoire aiguë à une douleur chronique (Corder et *al.*, 2013), en particulier grâce à l'activité des récepteurs μ - opioïdes toniques (MOR) qui suppriment l'hyperalgésie après la résolution de l'inflammation. Ainsi, les opioïdes endogènes et xénobiotiques sont les plus efficaces immédiatement après une lésion tissulaire, ce qui suggère que les premières phases de l'inflammation déclenchent la signalisation des récepteurs opioïdes dans les neurones afférents nociceptifs (Stein et Lang, 2009 ; Joseph et *al.*, 2010).

Parmi les opioïdes à faible efficacité, la codéine est utilisée pour soulager la douleur légère à modérée. La morphine est un analgésique opioïde à haute efficacité qui est utilisé pour soulager les douleurs sévères (Rossiter, 2012).

Les médicaments opioïdes sont souvent connus par leurs effets antalgiques mais également pour leur propriétés antitussives (la codéine en sirop) ou anti-diarrhéique (présence de poudre d'opium dans le COLCHIMAX® pour contrer l'effet diarrhéique de la colchicine). Comme n'importe quel médicament, les opioïdes possèdent des effets indésirables. On note des signes aigus comme (les nausées ou les vomissements et la constipation) et des signes chroniques tels que (sédation, une anorexie, une dépression du système immunitaire, des spasmes des voies urinaires, un myosis, une constipation chronique, un fort déséquilibre hormonal (Maya, 2019), un risque accru de fracture osseuse et l'infarctus du myocarde (Chou et *al.*, 2015).

V.3.3. Analgésiques naturels

L'utilisation de produits naturels, principalement des plantes médicinales, est l'une des anciennes thérapies utilisées par l'humanité (Li et Vederas, 2009). Au cours des dernières années, les gens sont impatients d'utiliser des médicaments à base de plantes en raison de leurs complications moindres et des effets secondaires moindres que les drogues synthétiques (Boyd et *al.*, 2013). En ce qui concerne la demande croissante de plantes médicinales et de

composés apparentés, les études phytopharmaceutiques et l'utilisation de ces remèdes pour la prise en charge de la douleur se sont multipliées dans le monde (Garg et Adams, 2012).

Dans le Tableau 7, on a mentionné certaines plantes médicinales les plus importantes ayant des propriétés analgésiques ainsi que leurs mécanismes possibles (Dehkordy et *al.*, 2017).

Tableau 7: Plantes médicinales à effet analgésique.

| Nom scientifiques (famille) | Mécanismes |
|---|--|
| <i>Salvia hydrangea</i> (Lamiaceae) | Inhibition des voies de synthèse des prostaglandines (Sonboli et <i>al.</i> , 2009) |
| <i>Lavandula officinalis</i> (Lamiaceae) | Affecter les processus inflammatoires (Heidari et <i>al.</i> , 2000). |
| <i>Melissa officinalis</i> (Lamiaceae) | Mécanisme analgésique central (Miladi et <i>al.</i> , 2006) |
| <i>Menthe pulegium</i> (Lamiaceae) | Inhibition de la synthèse de NO et des médiateurs inflammatoires et des récepteurs NMDA et stimulation des récepteurs opioïdes (Mokhtari et <i>al.</i> , 2009) |
| <i>Ziziphora tenuior</i> (Lamiaceae) | Inhibition de la libération d'acide arachidonique et de la synthèse des prostaglandines et action sur le système opioïde (Shahraki et <i>al.</i> , 2006) |
| <i>Teucrium polium</i> (Lamiaceae) | Se connecter aux récepteurs de la douleur et affecter les canaux sensibles au ligand et diminuer le taux d'entrée du sodium (Nasri et <i>al.</i> , 2011) |
| <i>Stachys lavandulifolia</i> Lamiaceae | Inhibition de la cyclo-oxygénase (Nasri et <i>al.</i> , 2009). |
| <i>Apium graveolens</i> (Apiaceae) | Inhibition de la cyclo-oxygénase (Zendehdel et <i>al.</i> , 2009). |
| <i>Glycyrrhiza glabra</i> (Fabaceae) | Inhibition de l'extravasation des leucocytes et production de médiateurs inflammatoires chez les neutrophiles (Zareian et <i>al.</i> , 2003). |
| <i>Crocus sativus</i> (Iridaceae) | Inhibition possible des récepteurs NMDA et synthèse d'acide nitrique (Zardooz et <i>al.</i> , 2009) |
| <i>Foeniculum vulgare</i> (Apiaceae) | Récepteur sérotonergique et histaminergique (Taherian et <i>al.</i> , 2007). |

| | |
|---|---|
| <i>Hypericum perforatum</i> (Clusiaceae) | Inhibition des enzymes COX et LO-5 (Khaksarian et <i>al.</i> , 2004). |
| <i>Aloe vera Barbedensis</i> (Aloeaceae) | une action anti-inflammatoire en inhibant l'enzyme cyclooxygénase et en diminuant la sécrétion de prostaglandine E2 à partir de l'acide arachidonique (Thombre et <i>al.</i> , 2019). |
| <i>Zingiber officinale</i> (Zingiberaceae) | les principes actifs du gingembre ont bloqué le métabolisme de l'acide arachidonique, les voies de la cyclooxygénase (COX) et de la lipooxygénase (LOX) (Thombre et <i>al.</i> , 2019). |
| <i>Ocimum sanctum</i> (Lamiaceae) | inhibition des prostaglandines, de l'histamine et de l'acétylcholine (Thombre et <i>al.</i> , 2019). |

Matériels et Méthodes

I. Matériels

I.1. Matériel végétal

Il est constitué de la partie aérienne de la plante médicinale *Ephedra nebrodensis* récolté en mai 2017 dans la localité de Nafla (commune de Hidoussa) dans la wilaya de Batna (Figure 8 et 9). L'identification a été faite par le Pr. Laouer Hocine (Laboratory of Natural Resources Valorization, Department of Biology and Vegetal Ecology, University of Setif 1, El Bez, 19000, Algeria). Un spécimen de la plante a été déposé à l'herbier du Laboratoire de Botanique de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Sétif 1, sous le numéro SNV004/20.



Figure 8: Champ d'*Ephedra nebrodensis* dans les montagnes des Aurès (A), la plante dans la nature en mois de mai 2017 (B).



Figure 9: Partie aérienne entière (A), fleurs, fruits (B) et tiges (C) d'*E. nebrodensis*.

I.2. Animaux

Des souris *Albinos swiss* et des rats mâles et femelles de la souche *Wistar albinos* qui proviennent de l'institut pasteur-Alger.

Ils ont été placés dans des cages en plastique avec un accès libre à la nourriture et à l'eau pendant 15 jours, ils sont maintenus dans une animalerie à une température ambiante, à un éclairage naturel et de lumière/obscurité 12H/12H. Le comité d'éthique de la faculté des Sciences de la Nature et de la vie de l'Université Ferhat Abbas, Sétif 1, a approuvé les protocoles expérimentaux réalisés sur les animaux.

I.3. Réactifs chimiques et équipements

Folin-ciocalteu, carbonate de sodium (Na_2CO_3), trichlorure d'Aluminium (AlCl_3), acide gallique, quercitine, l'acide tannique, acide ascorbique, l'hydroxyanisole butylé (BHA), α -tocophérol et l'hydroxytoluène butylé (BHT), dimethyl sulfoxide (DMSO), 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•), (ABTS) 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique), potassium de ferricyanide (K_2Fe), persulfate de potassium ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), acide trichloracétique (TCA), TBA (thiobarbiturique acide), chlorure ferrique (FeCl_3), β -carotène, acide linoléique, Tween 40, phosphate mono-potassique (KH_2PO_4) et phosphate di-potassique (K_2HPO_4), eau distillé, Acétate d'ammonium (NH_4Ac), néocuproïne, Chlorure de cuivre (CuCl_2), DTNB 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid), AchE, BchE, l'iodure d'acétylthiocholine (ACĪ), Chlorure de butyrylthiocholine (BuCi) et polyvinylpolypyrrolidone (PVPP). Méthanol (CH_3OH), chloroforme (CHCl_3), Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), acétate d'éthyle, acétone, *n*-butanol ont été obtenus auprès de Merck (Darmstadt, Allemagne), acide acétique, EDTA (éthylène diamine tétra acétique). Tous les produits proviennent des laboratoires Sigma-Aldrich (Allemagne), Fluka (France), Riedel-de Haën et Prolabo.

Parmi l'appareillage utilisé :

Rotavapeur (BÜCHI B-490), Spectrophotomètre UV-VIS à double faisceau (JENWAY 6305 UV/VIS), Balance de Précision (OHAUS), Vortex (JANKE & KUNKEL), Centrifugeuse réfrigérée (ROTINA 420 R-HETICH), Bain marie (MEMMERT), pH mètre (Hanna), Agitateur Magnétique (SCIOLOGEX), lecteur microplaque 96 puits, HPLC-MS et GC-MS.

II. Méthodes

II.1. Préparation des extraits végétaux

La partie aérienne de la plante récoltée a été bien nettoyée et séchée à l'abri de l'humidité et de la lumière de soleil à température ambiante pendant 7 jours. Ensuite la plante a été broyée pour obtenir une poudre fine stockée soigneusement dans des sachets en papiers, dans un endroit sec en vue de son analyse.

II.1.1. Préparation de l'extrait aqueux

L'extraction aqueuse par décoction est réalisée selon la méthode d'Attah *et al.* (2019) avec une légère modification. Brièvement, 50 g de la poudre de la plante sont mis à ébullition à 100°C pendant 20 minutes dans 500 mL d'eau distillé. Après une filtration de 3 reprises sur papier filtre de type Whatman N° 04, l'extrait aqueux a été séché dans l'étuve à 40°C pendant 4 jours, puis l'extrait aqueux (AQ) obtenu est conservée à -4 °C jusqu'à son utilisation.

II.1.2. Préparation des extraits hydro-alcooliques

L'extraction de la partie aérienne de la plante a été effectuée selon Annapandian et Sundaram (2017). Brièvement, 100 g de la plante sont ajoutés au 1000 mL de différents solvants : acétate d'éthyle (EtOAc), Ethanol (EtOH) 70%, Méthanol (MeOH) 85% et Ethanol :acétone (EtOH:AC) 50:50. Les mélanges ont mis à macération avec agitation de 72h. Ensuite les mélanges ont été filtrés sur papier filtre de type Whatman N° 01 et évaporés par un rotavapeur (BÜCHI) à fin d'éliminer les solvants organiques. Ensuite le séchage des extraits a été réalisé dans une étuve à 42°C. À la fin les extraits sont préservés de la lumière pour éviter toute dégradation des molécules.

II.1.3. Préparation des fractions a partir de l'extrait hydro-éthanolique

Le fractionnement de l'extrait ethanolique 70% (EtOH) est réalisé à l'aide d'une série de solvants selon la polarité. L'extrait brut est d'abord mélangé avec de l'hexane (V / V) pour éliminer les lipides, et après la séparation, la partie supérieure organique est récupérée. Cette étape est répétée plusieurs fois. La phase de l'hexane est ensuite évaporée et la fraction résultante est considérée comme la fraction d'hexane (FH). La fraction aqueuse inférieure a ensuite été fractionnée avec du chloroforme pour donner la fraction chloroformique (FC), puis

avec de l'acétate d'éthyle pour donner la fraction d'acétate d'éthyle (FAE), un autre solvant *n*-butanol pour donner la fraction butanolique (FB), et enfin la fraction aqueuse (FA). Toutes les fractions ont été évaporées, séchées et stockées à -4°C jusqu'à son utilisation (Mergham et al., 2020).

II.2. Analyse quantitative

II.2.1. Détermination des polyphénols totaux dans les extraits

Le dosage des polyphénols est déterminé selon la méthode de folin-Ciocalteu réalisé par Müller (2010). Cette méthode est basé sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungustique ($H_3PW_1O_{40}$) et phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$) de réactif Folin-Ciocalteu par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleu foncé. L'intensité de la coloration produite, qui a une absorbance maximale à 765 nm est proportionnelle à la quantité des polyphénols présente dans les extraits analysés (Georgé et al., 2005).

20 μ L des échantillons sont ajoutés à 100 μ L de réactif de Folin-Ciocalteu dilué à 1:10 et 75 μ L de carbonate de sodium (Na_2CO_3) (7,5%). Après 2 heures d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 765 nm par un lecteur microplaque de 96 puits. L'acide gallique (0-200 μ g / mL) a été utilisé pour la courbe d'étalonnage comme un standard. Les résultats ont été exprimés en μ g d'équivalent acide gallique (GAE) par milligramme d'extrait (μ g EAG/mg d'extrait) (Figure 10).

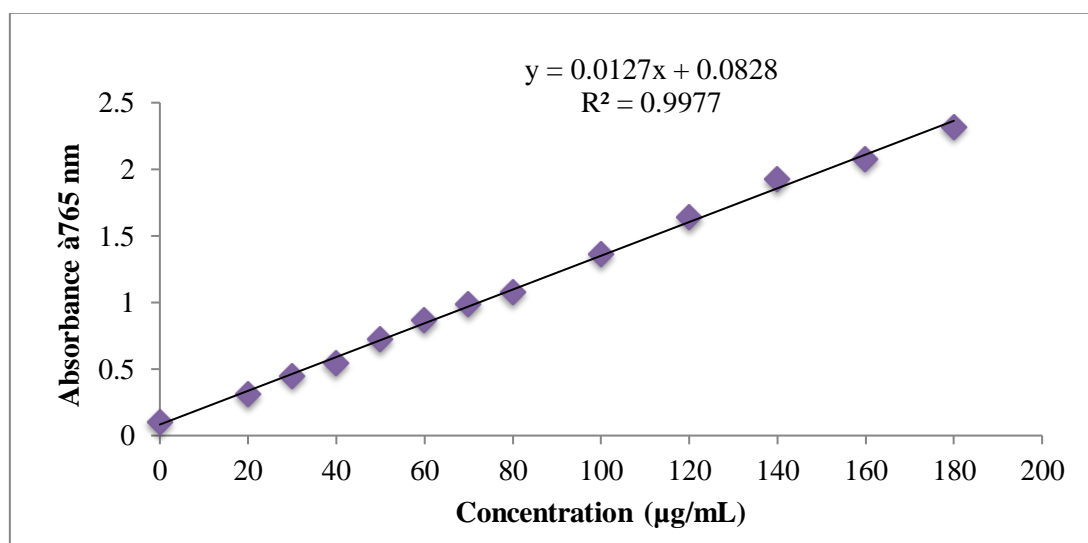


Figure 1: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique. Chaque valeur indique la moyenne \pm SD (n=3).

II.2.2. Détermination des flavonoïdes totaux dans les extraits

Le dosage des flavonoïdes a été déterminé selon la méthode de trichlorure d'Aluminium (AlCl_3) cité par Mouffouk et ses collaborateurs (2018). Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle libre (OH), qui est susceptible de donner en présence de AlCl_3 un complexe jaunâtre par chélation de l'ion Al^{3+} . La coloration jaune produite est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes présents dans l'extrait (Basli *et al.*, 2012).

500 μL des extraits ont été ajoutés à 500 μL de la solution AlCl_3 (2% dans le méthanol). Après 10 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance a été lue à 430 nm. La concentration des flavonoïdes dans les extraits a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage établie avec la quercétine à différentes concentrations (0-40 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Les résultats sont exprimés en microgramme équivalent de quercétine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EQ}/\text{mg}$ d'extrait) (Figure 11).

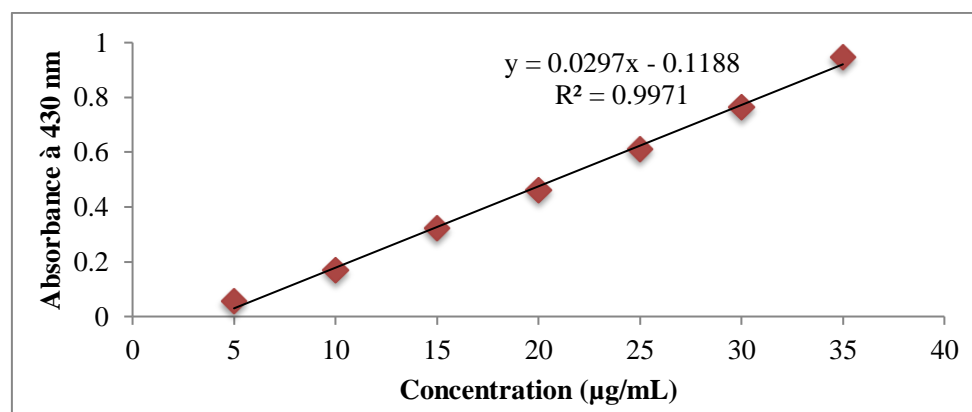


Figure 2: Courbe d'étalonnage de quercétine. Chaque valeur indique la moyenne \pm SD ($n=3$).

II.2.3. Détermination des tannins totaux dans les extraits

La teneur des tanins totaux a été estimée selon la méthode décrite par Gharzouli *et al.* (1999). Cette méthode est basée sur la détermination de la précipitation de l'hémoglobine d'un échantillon de sang frais des bovins. La propriété des tannins de former des complexes avec les protéines constitue l'un des principes de détermination du taux des tannins dans les extraits.

500 μL des extraits a été mélangé avec 500 μL de sang hémolysé (absorbance = 1,6), le mélange a été incubé pendant 20 min ensuite a été centrifugé à 4000T/min pendant 10 min.

L'absorbance du surnageant a été mesurée à 576 nm. Les résultats sont exprimés en μg équivalent d'acide tannique par mg d'extrait (μg EAT/ mg d'extrait) (Figure 12).

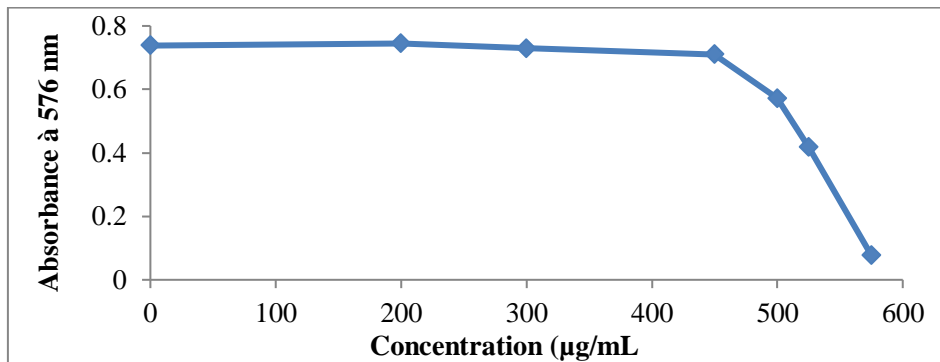


Figure 3: Courbe d'étalonnage de l'acide tannique. Chaque valeur indique la moyenne \pm SD (n=3).

II.3. Analyses qualitatives

II.3.1. Chromatographie sur couche mince CCM

La Chromatographie sur Couche Mince ou CCM est une méthode analytique couramment utilisée pour la séparation et l'identification rapides des constituants d'un extrait. Les plaques de CCM utilisées sont des plaques d'aluminium constituées de Silica gel de type 60 F254 (MERCK, Germany).

Les extraits obtenus sont analysés par chromatographie sur couche mince CCM par un système d'éluant (S1) : acétate éthyle (EtOAc)- méthanol- eau- acide formique (50 /10 /7 /1), et le deuxième système éluant (S2) c'était : dichlorométhane-méthanol-ammoniaque (40 /10 /0,5). A la fin de la migration, les plaques sont séchées et examinées sous la lampe UV (254 et 365 nm) ; les différents spots sont mis en évidence après pulvérisation avec Réactif de vanilline sulfurique pour les composés tels que les tannins, les terpénoïdes et les flavonoïdes. Ce révélateur universel est préparé en dissolvant 1g de vanilline dans 2mL d'acide sulfurique H_2SO_4 et de l'éthanol à 95% en quantité suffisante pour 100 mL. Réactif de ninhydrine $\text{C}_9\text{H}_4\text{O}_3$ pour mettre en évidence les alcaloïdes (on a dissout 0,4g de Ninhydrine dans 200 mL de *n*-butanol avec une agitation jusqu'à la dissolution complète de réactif) et aussi le réactif 2-aminoéthyl-diphénylborate de sodium ou (réactif de NEU) pour mettre en évidence les flavonoïdes. Après pulvérisation et chauffage des plaques de CCM à 110°C pendant 1 min. plusieurs colorations apparaissent en fonction du type des composés, aussi on peut caractériser les composés possibles selon leurs rapports frontaux (Markham, 1982).

II.3.2. Analyse HPLC-DAD-MS des extraits d'*Ephedra nebrodensis*

Les analyses ont été effectuées sur un HPLC-DAD-MS Thermo Scientific Dionex U3000 (Thermo-Dionex, Les Ulis, France) composé d'une pompe quaternaire (LPG-3400 SD), d'un thermo-échantillonneur (WPS-3000TSL), d'un thermostat de colonne (TCC-3000SD) et d'un détecteur à barrettes de diodes (DAD-3000) en ligne avec un spectromètre de masse quadripolaire (Surveyor MSQ plus System (Thermo-Dionex, Les Ulis, France).

L'identification des composés phénoliques dans les différents extraits d'*E. nebrodensis* est effectuée par chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS) au laboratoire de pharmacognosie, « *Faculty of Health, UFR Pharmacy, 75270 Paris Cedex 06, France* ». Les extraits (1 mg/mL) sont dissouts dans le méthanol puis 10 µL de chaque extrait sont injectés dans une colonne analytique de type phénylhexyle (4,6 × 250mm) et maintenue à 20°C tout au long de la période d'analyses. La phase mobile est constituée de deux éluant : (A) l'acétonitrile et l'eau (V/V) et acide formique (0,05%). (B) acide formique aqueuse (0,1%). Le gradient d'éluion appliqué est de type binaire étalé sur 45 min. Le débit était de 0,7 mL/min. Le détecteur à barrettes de diodes a recueilli des données UV entre 200 et 400 nm, ce qui a permis d'obtenir des spectres UV. Le spectromètre de masse a fonctionné en mode d'ionisation négative dans les conditions de fonctionnement suivantes : tension de pulvérisation d'ions de 3 kV, énergie de 70 V, Tension du cône 50 V, température de désolvatation 500°C et énergie ionique 0,8 V. Dans tous les cas, les spectres de masse ont été acquis dans la gamme de 100-1000 Th.

L'éluion par gradient a commencé par 15-85% B (de 0 à 2 min), 72 - 28% B de (2 à 30 min), maintenu à 28% B pendant deux minutes (de 30 à 32 min), 60 - 40% B de 32 à 35 min, maintenu à 40 % B pendant trois minutes (de 35 à 37 min), retour rapide à 85% B en cinq minutes (de 37 à 40 min) et maintenu pendant 5 minutes (de 40 à 45 min). Une détection à une longueur d'onde de 356 nm a été utilisée pour présenter les chromatogrammes.

II.3.3. Identification des alcaloïdes par chromatographie en phase gazeuse couplée à la masse (CPG-MS)

II.3.3.1. Préparation des échantillons (silylation)

Le prétraitement des échantillons, dans notre cas les extrais ne sont pas volatils, on a réalisé une dérivation pour les rendre volatils selon Lv et *al.* (2015).

On a préparé des échantillons de 50 mg/mL, dans des petits vials on va prendre 500 μ L de ces échantillons et on ajoute 156,25% μ L de Methoxyamine hydrochloride (dissoudre 10 mg dans 1 mL de pyridine), le mélange a été incubé à 37°C pendant 120 min et évaporé dans un multi-vapor, après on a ajouté 200 μ L de N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide (MSTFA), à la fin le volume injecté dans la CPG-MS est de 1 μ L de l'échantillon silylé.

II.3.3.2. Méthode utilisée pour CPG-MS

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse a été réalisée sur GC MS-QP2010 Ultra (Shimadzu Co. Kyoto. Japon) équipé d'une colonne capillaire de longueur (122-5032 :30m \times 0,250 mm \times 0,25 μ m DB-5. La détection a été réalisée par un spectromètre de masse Agilent 5973N en mode d'ionisation par impact électronique, avec une température de source de 200 °C, température d'interface : 250°C, Mode : balayage et une énergie d'ionisation de 70 eV.

- Gaz vecteur : hélium avec un débit de 1 mL/min, et un split ratio de 50,00 (Mode d'injection : Split, Pression : 61.3 KPa, Débit total : 54.0 mL, Débit de la colonne : 1,22 mL/min, Débit de la purge : 3ml/min)
- Température de la colonne : 70 °C
- Température de l'injecteur : 250 °C
- Volume d'injection : 1 μ L

Les échantillons ont été analysés avec la colonne maintenue initialement pendant 2 minutes à 70 °C après l'injection, puis la température a été augmentée à 250°C avec une rampe de chauffage à 10°C/minute, avec un maintien de 2 minutes est la température de 320°C.

L'identification des composés a été faite en faisant comparer leurs spectres de masse avec la bibliothèque du NIST14.

II.4. Etude toxicologique de l'extrait aqueux

II.4.1. Toxicité aigus chez les souris

L'évaluation de la toxicité aiguë des extraits hydro-alcooliques (MeOH 85%, EtOH 70%, EtAce et EtOAc) et aqueux (AQ) d'*E. nebrodensis* a été estimée selon la procédure décrite dans la ligne directrice de l'Organisation de coopération et de développement économiques

(OCDE 420, 2001), qui conduit à déterminer les effets nuisibles des produits sur le poids corporel et sur les organes cibles (foie et les reins).

Dans cette étude nous avons utilisés des souris *Albinos Swiss* mâles et femelles pesant entre (25 - 35 g). Les extraits ont été solubilisés dans l'eau distillé et administré par voie orale à deux doses uniques 2g/kg et 5g/kg, les animaux ont été mets à jeun 12 h avant l'administration. Les souris ont été répartir en 3 groupes (4 mâles et 4 femelles) pour chacun de la manière suivante :

Groupe témoin (4 mâles et 4 femelles) : non traité

Groupe I (4 mâles et 4 femelles): reçoit 2g/kg des extraits AQ, MeOH 85%, EtOH 70%, EtAce et EtOAc par gavage.

Groupe II (4 mâles et 4 femelles): reçoit 5g/kg les extraits AQ, MeOH 85%, EtOH 70%, EtAce et EtOAc par gavage.

II.4.1.1. Observations

Après l'administration orale des extraits, les souris sont surveillées régulièrement durant les premières 24 et 48 h et quotidiennement par la suite pendant 14 jours pour permettre d'enregistrer les effets tardifs y compris le nombre de mortalité. Aussi pour voir s'il y a des changements significatifs dans le comportement des animaux, l'altération de l'activité locomotrice, activités physiologiques, la respiration, des effets cutanés et les effets gastro-intestinaux, ou autres anomalies.

II.4.1.2. Poids corporel

Avant l'administration des extraits, nous avons procédé à la prise de poids quotidienne des animaux pendant 14 jours de traitement (1^{er}, 5^{eme}, 10^{eme} et le 14^{eme} jour) avec la pesée de la quantité de nourriture consommée et le volume d'eau ingéré afin de vérifier d'éventuelles variations pendant le traitement.

II.4.1.3. Etude histologique

Vers le 15^{eme} jour les animaux ont été mets à jeun pendant 12h avant leurs sacrifices. Après la dissection des animaux, les organes (foie, reins et cœur) ont été prélevés et bien rincés par l'eau physiologique, ensuite ont été fixés dans le formol 10% pour des analyses histologiques.

L'observation microscopique des différentes altérations et anomalies au niveau des tissus a été fait par microscope *Lieca DM 1000-10-20* (X10).

II.4.2. Toxicité subaiguë de l'extrait aqueux

Dans le but d'évaluer la toxicité subaiguë de l'extrait (AQ) d'*E. nebrodensis*, nous avons utilisés 16 rats mâles et 16 femelles de la souche *Albino Wistar* provenant de l'institut pasteur (Alger), avec un poids moyen de $157,32 \pm 6,51$ g. Les rats sont mis dans des cages Pour une période d'acclimatation (2 semaines) avant être utilisés dans l'expérience, pendant cette période les animaux ont un accès libre à la nourriture et à l'eau, ils sont maintenus dans une animalerie à une température ambiante, à un éclairage naturel de lumière/obscurité 12H/12H. Les animaux ont été répartis en 4 groupes chacun contient 4 mâles et 4 femelles, Après un jeun de 12 h, la solution d'extrait a été administrée à différentes doses par gavage 300 mg/kg, 600 mg/kg et 1200 mg/kg de l'extrait (AQ) chaque jours pendant 30 jours de la manière suivante :

Groupe témoin (4 mâles et 4 femelles) : reçoit de l'eau distillée.

Groupe D1 (4 mâles et 4 femelles) : reçoit 300 mg/kg de l'extrait (AQ) pendant 30 jours.

Groupe D2 (4 mâles et 4 femelles) : reçoit 600 mg/kg de l'extrait (AQ) pendant 30 jours.

Groupe D3 (4 mâles et 4 femelles) : reçoit 1200 mg/kg de l'extrait (AQ) pendant 30 jours.

Les rats ont été pesés quotidiennement (1^{er} jr, 7^{eme} jr, 14^{eme} jr, 21^{eme} jr et 28^{eme} jr), Après les 4 semaines de traitement.

II.4.2.1. Prélèvement du sang et des organes

A la fin de l'expérience, les animaux ont été anesthésiés et le sang a été prélevé au niveau de l'œil par ponction dans le sinus retro-orbital à l'aide des tubes d'hématocrite et récupéré dans des tubes. Après dissection, Les organes (foie, reins, cœur, poumons, rate, cerveau, testicules et épидидymes) ont été prélevés, dégraissés et pesés pour voir s'il y a des changements dans le poids relatif de ces organes. Une partie du foie, des reins et du cœur a été conservée dans une solution de formol à 10 % pour l'analyse d'histopathologique.

II.4.2.2. Dosage des paramètres hématologiques et biochimiques

Le sang récupéré dans des tubes EDTA serve aux analyses hématologiques (GR: globules rouges, GB: globule blancs, HTC: hématocrite, PLT: plaquettes, HGB : hémoglobine, VGM: volume globulaire moyenne, MCH: concentration moyenne d'hémoglobine, MCHC: concentration moyenne d'hémoglobine corpusculaire, MPV: volume moyen des plaquettes). Ces analyses ont été réalisées par un automate type MEDONIC M32 séries.

Le sang récupéré dans des tubes héparines a été centrifugé à 4000 tours/minute pendant 10 min. Les sérums sont récupérés et conservés à - 4° C jusqu'à leurs utilisation pour les analyses biochimiques. Pour le bilan hépatique (ALAT : alaline aminotransférase, ASAT : aspartate aminotransférase, PAL : phosphatase alcaline), bilan rénale (urée et CREA : créatinine), bilan lipidique (CHOL : cholestérol, TRIG : triglycéride et GLUC : glucose), bilan protidique (ALB : albumine, PT : protéines totaux) aussi BIL D : bilirubine directe, BIL T : bilirubine total, Na⁺ : sodium, K⁺ : potassium et AU : acide urique. Ces analyses ont été effectuées par l'automate ADVIA 1800 SIEMENS, au niveau de laboratoire d'analyses central, CHU Saadna Abdenour de Sétif. Algérie.

II.4.2.3. Réalisation des coupes histologiques

Après la fixation du foie, des reins et le cœur dans le dans le formol (10%), on les a coupés en petits morceaux. Ces organes sont déshydratés par passage dans trois bains d'éthanol successifs de 30 min à (70°, 90° et 100°C). Ensuite ils sont éclaircis dans deux bains de 20 min de toluène et inclus dans la paraffine (deux bains de 2 heures chacun). L'opération a été réalisée par un automate (TISSUE-TEK). L'inclusion définitive est ensuite réalisée dans des moules métalliques. Les blocs de paraffine obtenus sont ensuite coupés par microtome, pour obtenir des coupes fines de 5 µm d'épaisseur, après ils sont étalées sur des lames avec un gel de gélatine à 2 % puis séchées dans une étuve réglée à une température de 35-42 C, réhydratées et colorées à l'hématoxyline-éosine. La réalisation des coupes histologiques a été effectuée au niveau du laboratoire d'anatomie pathologique de CHU de Sétif.

II.4.3. Toxicité chronique

Pour tester l'effet à long terme de l'extrait (AQ), on a fait une étude qui a duré 90 jours sur des rats mâles et femelles de la souche *Albinos Wistar*, avec un poids moyen de 174,60 ±

12,70 les animaux ont été répartis en 4 groupes de 5 rats mâles et 5 rats femelles pour chacun de la manière suivante :

Groupe témoin (5 males et 5 femelles) : reçoit de l'eau distillée.

Groupe D1 (5 males et 5 femelles) : reçoit 300 mg/kg de l'extrait (AQ) pendant 90 jours.

Groupe D2 (5 males et 5 femelles) : reçoit 600 mg/kg de l'extrait (AQ) pendant 90 jours.

Groupe D3 (5 males et 5 femelles) : reçoit 1200 mg/kg de l'extrait (AQ) pendant 90 jours.

Les animaux ont été reçu par gavage les différentes doses de l'extrait (AQ) quotidiennement pendant 90 jours.

II.4.3.1. Dissection et prélèvement du sang et de plasma

Après les 3 mois de traitement, les rats ont été anesthésie pour la collecte du sang et les organes. Le prélèvement sanguin ce fait à partir de la veine porte. Le sang est récupéré dans des tubes qui contiennent EDTA pour analyser les paramètres hématologiques (GR: globules rouges, GB: globule blancs, HTC: hématocrite, PLT: plaquettes, HGB: hémoglobine, VGM: volume globulaire moyenne, MCH: concentration moyenne d'hémoglobine, MCHC: concentration moyenne d'hémoglobine corpusculaire, MPV: volume moyen des plaquettes).ensuite le sang récupéré dans des tubes héparines, il est centrifugé à 3000 T/min pendant 20 min pour récupérer le plasma pour analyser les paramètres biochimiques (bilan rénale, hépatique et lipidique).

II.4.3.2. Prélèvement des organes

Après la dissection des animaux les organes prélevés (foie, reins, cœur, poumons, rate et cerveau, testicules, épидидymes et ovaires) ont été bien dégraissé et rincé avec l'eau physiologique froide, après ont été pesés et fixé immédiatement dans la solution de formol 10 % pour l'analyse histopathologique ultérieur.

II.5. Evaluation de l'activité antioxydante in vitro

II.5.1. Activité scavenger du radical libre DPPH• (2,2 diphényl 1 picryl hydrazine)

Pour étudier l'activité anti-radicalaire des extraits nous avons choisi la méthode colorimétrique qui utilise le DPPH• comme un radical libre relativement stable. Selon le protocole décrit par Blois (1958) .En présence des piègeurs des radicaux libres, le DPPH (2,2

diphényl 1 picryl hydrazyle) de coloration violette foncé se réduit en (2,2 diphényl 1 picryl hydrazine) de couleur jaune (Figure 13) (Koleva et al., 2002).

Le DPPH• est considéré comme un radical lipophile stable. Une réaction en chaîne dans les radicaux lipophiles a été initiée par l'autoxydation des lipides. Les antioxydants réagissent avec le DPPH•, réduire un nombre de molécules de DPPH égal à leur nombre des groupes hydroxyles disponibles. Par conséquent, l'absorption à 517 nm était proportionnel à la quantité de DPPH• résiduelle (Xu et al., 2005).

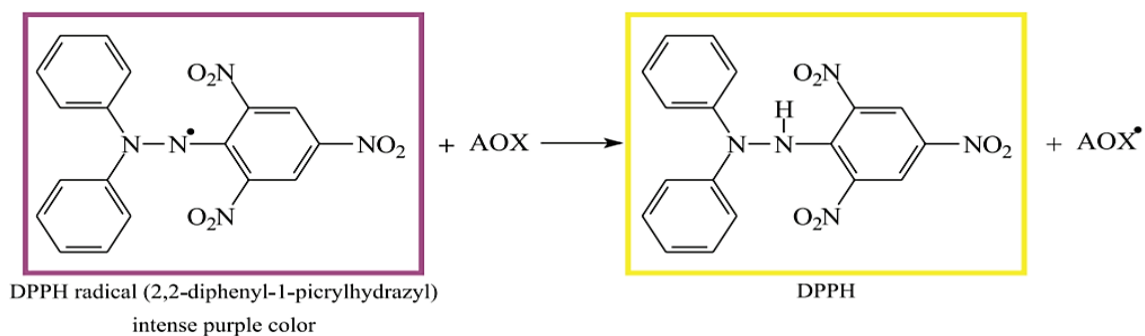


Figure 4: Réaction chimique impliquée dans le test spectrophotométrique DPPH (Prior et al., 2005).

A chaque volume de 40 µL des extraits ou standard on ajoute 160 µL de la solution de DPPH (0,004%) préparé dans le méthanol, après une agitation, le mélange a été incubé à température ambiante pendant 30 min, la lecture de l'absorbance a été faite contre un blanc préparé dans les mêmes conditions dans le méthanol à 517 nm.

Le pourcentage de l'activité antioxydante (I%) a été calculer selon l'équation suivante :

$$\text{Effet de piégeage de DPPH}\% = [(Ab_{\text{contrôle}} - Ab_{\text{échantillon}}) / Ab_{\text{contrôle}}] \times 100$$

La concentration inhibitrice à 50% (IC₅₀) est définie étant la concentration du substrat qui cause la dégradation de 50% de DPPH (c'est-à-dire les concentrations d'échantillons nécessaire pour piéger 50 % des radicaux libres), elle a été calculée par régression linéaire à partir des graphes des taux d'inhibition et elle est exprimée en µg/mL et comparé avec celle de standard BHT.

II.5.2. Test de piégeage du radical ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique))

Constitue la base de l'une des méthodes spectrophotométriques qui ont été appliquées à la mesure de l'activité antioxydante totale des solutions de substances pures (Rice-Evans et al., 1995 ; Miller et al., 1996).

ABTS^{•+} est un radical organique synthétique de bleu-vert, qui peut être réduits en présence d'antioxydants, avec la décoloration qui résulte (Figure 14).

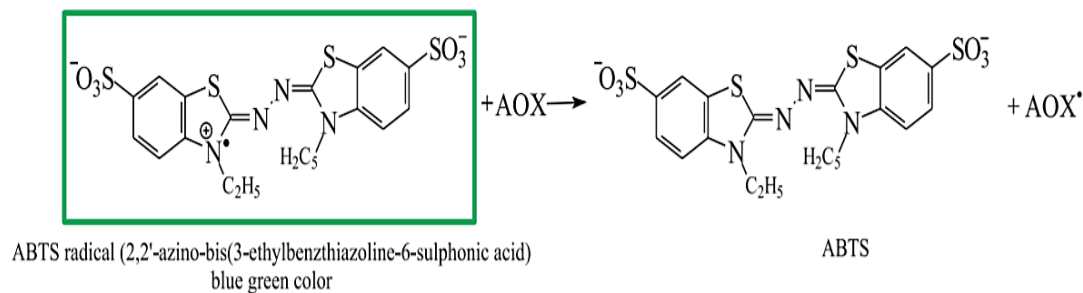


Figure 5: Réaction chimique impliquée dans le test spectrophotométrique ABTS (Prior et al., 2005).

L'activité antioxydante des extraits brutes a été évaluée par l'amélioration de la capacité de piégeage des cations radicaux ABTS^{•+} en utilisant la méthode d'écrit par Re et al. (1999). Le cation radical ABTS^{•+} a été produit en mélangeant 7 mM de 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6 acide sulfonique) (ABTS) et 2,45 mM de persulfate de potassium (K₂S₂O₈) incubés à température ambiante dans l'obscurité pendant 16 H. La solution de travail d'ABTS^{•+} est obtenue en diluant la solution mère avec du méthanol jusqu'à obtention d'une absorbance finale entre 0,7 et 0,9. Pour déterminer l'activité de piégeage des radicaux ABTS, on mélange soigneusement 160 µL de solution d'ABTS^{•+} avec 40 µL de concentrations différentes d'échantillons d'essai. La réaction a été incubée à température ambiante pendant 10 min dans l'obscurité et l'absorbance a été immédiatement mesurée à 734 nm par un lecteur de microplaque de 96 puits. Un témoin blanc ou négatif approprié (solution ABTS avec le méthanol) a été utilisé. Le BHT et BHA ont été utilisées comme produits antioxydant de référence. Le pourcentage d'inhibition a été calculé en utilisant la formule suivante:

$$\text{Activité scavenger d'ABTS}^{\bullet+} (\%) = (A_C - A_E / A_C) \times 100$$

Où A_c : est l'absorbance du contrôle négatif, A_E : l'absorbance de l'échantillon d'essai. L'CI₅₀ de chaque échantillon a été déterminée graphiquement (n = 3).

II.5.3. Activité anti-oxydante par le test CUPRAC (CUPRIC Reducing Antioxidant Capacity)

La capacité antioxydante réductrice cuivrique a été déterminée méthode d'Apak et *al.* (2004).

Brièvement, 40 µL des extrait à différentes concentrations ont été ajouté à 60 µL de NH₄Ac (1 M, pH 7,0), ensuite 50 µL de néocuproïne 7,5 mM et 50 µL de solution de Cu (II) 10 mM ont été ajoutés au mélange initial. Après 1h, l'absorbance à 450 nm était mesuré contre un réactif blanc. Les résultats ont été donnés exprimés par des absorbances et comparés avec ceux de BHA et de BHT utilisées comme antioxydants standards. Les résultats ont été donnés en A_{0.50} (µg / mL) qui correspond à la concentration fournissant une absorbance de 0.50.

II.5.4. Test de blanchissement de β-carotène

Dans cette étude l'activité antioxydante est déterminée en mesurant l'inhibition des composés volatils et les hydro peroxydes à double liaisons conjugués qui apparaissent lors de l'oxydation de l'acide linoléique. Donc elle consiste de mesurer la décoloration du β-carotène (orange) résultant de son oxydation par les produits de décomposition de l'acide linoléique (Gursoy et *al.*, 2012). La dispersion de l'acide linoléique et du β-carotène dans la phase aqueuse est assuré par du tween (Dapkevicuis et *al.*, 1998).

Le test de β-carotène est effectué selon la méthode d'écrit par Marco (1968). Brièvement, 1 mg de β-carotène a été dissous dans 2 mL de chloroforme, puis 50 µL de l'acide linoléique et 400 mg de tween40 sont ajoutés à la solution obtenue. Après évaporation de chloroforme par rotavapeur à 40°C, à la fin 200 mL d'eau distillé saturé d'oxygène est ajouté avec une agitation vigoureuse de l'émulsion résultante.

De cette nouvelle solution 140 µL sont transférés dans la micro-plaque et 60 µL de chaque extrait à différentes concentrations sont ajoutés. La même procédure est répétée pour les contrôles positifs (BHT et BHA). L'absorbance a été mesuré à 490 nm à différents intervalles (0, 30, 60, 90 et 120 min), avec l'incubation de la microplaque à 45°C. L'activité anti-oxydante (AA%) est calculé par l'équation suivante :

$$\text{Activité Antioxydante (\%)} = (A_C - A_E / A_C) \times 100$$

Où A_c est le taux de blanchiment du β -carotène sans extrait et A_s est l'absorbance du β -carotène en présence de l'échantillon.

On a obtenu la concentration inhibitrice à 50% (CI_{50}) à partir de l'équation de régression des pourcentages d'inhibitions calculés.

II.5.5. Test de Pouvoir réducteur

la présence des réducteurs dans les extraits des plantes provoque la réduction de fer ferrique (Fe^{3+}) dans le complexe ferricyanide à la forme fer ferreux (Fe^{2+}) qui est déterminé par la détection spectrophotométrique, ayant une forte absorbance (couleur verte) à 700 nm (Oyaizu, 1986)

En bref, 10 μ L des extraits de différentes concentrations ont été mélangé à 40 μ l de tompou phosphate (pH : 6.6) et 50 μ l de potassium ferricyanide $K_3Fe(CN)_6$ (1%), le mélange est incubé à 50°C pendant 20 min après on ajoute 50 μ l d'acide trichloroacétique (TCA) (10%) et 40 μ L H_2O et 10 μ L de chlorure de Fer ($FeCl_3$) (0.1%) ont été ajoutés au mélange. L'absorbance a été mesuré à 700 nm contre le blanc.

II.5.6. Test Chélation de fer

L'effet de chélation des extraits a été déterminé selon la méthode de Decker et Welch (1990) qui se base sur l'inhibition de la formation de complexe Fe^{2+} -ferrozine après le traitement des échantillons avec des ions Fe^{2+} .

Cette activité est déterminée selon la méthode de Decker et Welch (1990). Brièvement, 40 μ L de méthanol et 40 μ L d'extraits sont ajoutés aux 40 μ L Fe^{+2} (0,2 mM) et 80 μ L Ferene. Cette solution est incubée pendant 10 mn, la lecture est faite à 593 nm. Le control est le mélange de $FeCl_2$ et de Ferene, l'EDTA est utilisée comme standard. L'effet de l'alkylation des ions de fer est évalué par l'équation suivante :

$$\text{Activité chélation des métaux (\%)} = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$$

A_C : absorbance du control blanc. A_E : absorbance des solutions d'extrait.

II.6. Activité anti-cholinestérase *in vitro*

L'activité inhibitrice de l'Acétylcholinestérase et de la butyrylcholinestérase a été mesurée en modifiant légèrement la méthode spectrophotométrique développée par Ellman et *al.* (1961).

AchE de l'anguille électrique et BchE du sérum de cheval ont été utilisés, tandis que l'iodure d'acétylthiocholine (ACI) et le chlorure de butyrylthiocholine (BuCi) ont été utilisés comme substrats de la réaction. D-TNB a été utilisé pour la mesure de l'activité du cholinestérase. Brièvement, 150 μ L de tampon phosphate de sodium 100 mM (pH : 8), 10 μ L de la solution échantillon (4mg/mL) dissoute dans de le methanol à différentes concentrations et 20 μ L de solution AchE ou BchE préparés dans un tampon (pH : 8) ont été mélangés et incubés pendant 15 minutes à 25°C et 10 μ L de D-TNB (0,5 mM) ont été ajoutés. La réaction a ensuite été initiée par l'addition de 10 μ L d'iodure d'acétylthiocholine (0,71 mM) ou 10 μ L de chlorure de butyrylthiocholine (0,2 mM). L'hydrolyse de ces substrats a été contrôlée par spectrophotométrie par la formation d'anion 5-thio-2-nitrobenzoate jaune résultant de la réaction du D-TNB avec la thiocholine, libérée par l'hydrolyse enzymatique de l'iodure d'acétylthiocholine ou du chlorure de butyrylthiocholine, respectivement à une longueur d'onde de 412 nm en utilisant un lecteur de microplaques de 96 puits. La galanthamine a été utilisée comme composé de référence. Les résultats ont été donnés en pourcentage d'inhibition contre des concentrations de 25, 50, 100 et 200 μ g / mL, la CI_{50} a également été donnée.

II.7. Activité anti inflammatoire *in vitro*

Le principe consiste à l'inhibition de dénaturation du BSA provoquée par la chaleur (72°C). L'activité Anti-inflammatoire *in vitro* est déterminée par la méthode de Kandikattu (2013) avec des légères modifications.

Brièvement, 1 mL de chaque concentration d'extrait ou du standard (Diclofénac) a été ajouté à 1 mL de solution de BSA 0,2% préparé dans le Tris Hcl (pH : 6,6), les solutions ont été incubés à 37 C° pendant 15 min dans l'étuve. Puis dans un bain marie à 72°C pendant 5 min. Après refroidissement la turbidité a été mesurée à 660 nm dans un spectrophotomètre à cuve. Pour chaque concentration d'extrait. Un blanc est préparé dans 1 mL d'extrait et 1 mL de Tris-Hcl (Ce blanc a pour but de soustraire l'absorbance de l'extrait des résultats obtenus).

II.8. Effet des extraits sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton

L'effet anti-inflammatoire des extraits d'*E. nebrodensis* ont été testé par le modèle de l'œdème de l'oreille induit par l'application topique de l'huile de croton selon (Manga et al., 2004).

Afin de provoquer une inflammation cutanée, les souris avec un poids moyen $24,815 \pm 1,66$ (g) reçoivent sur la face interne de l'oreille droite 15 μ L d'une solution acétone-eau (1:1) contenant 80 μ g d'huile de croton comme agent irritant. Sur l'oreille gauche on a appliqué le même volume sans l'huile de croton. Les souris reçoivent par voie orale les extraits EtOH, MeOH, EtAce et EtOAc à différentes concentrations, Après une heure de l'application de l'huile de croton. Le groupe contrôle positif reçoit 50 mg/kg d'indométacine et le groupe contrôle négatif reçoit l'eau distillée. L'épaisseur de l'oreille a est mesurée par un pied à coulisse digital après 6 heures de l'induction de l'œdème (Delaporte et al., 2004). Le pourcentage d'inhibition de l'œdème est défini par rapport au groupe témoin (qui reçoit la solution de l'huile de croton et non traité) selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'inhibition} = (D_{\text{Témoin}} - D_{\text{Traité}} / D_{\text{Témoin}}) \times 100$$

$D_{\text{Témoin}}$: différence d'épaisseur pour le groupe témoin. $D_{\text{Traité}}$: différence d'épaisseur pour le groupe traité.

La répartition des souris a été faite de la manière suivante :

- **Groupe témoin** : reçoit l'eau distillée.
- **Groupe contrôle positif** : reçoit l'indométacine (50 mg/Kg).
- **Groupes A (A1, A2)** : reçoit 200 mg/kg et 400 mg/kg de l'extrait EtOH de la partie aérienne d'*E. nebrodensis*, respectivement.
- **Groupes B (B1, B2)**: reçoit 200 mg/kg et 400 mg/kg de l'extrait MeOH de la partie aérienne d'*E. nebrodensis*, respectivement.
- **Groupes C (C1, C2)** : reçoit 200 mg/kg et 400 mg/kg de l'extrait EtAce de la partie aérienne d'*E. nebrodensis*, respectivement.
- **Groupes D (D1, D2)**: reçoit 200 mg/kg et 400 mg/kg de l'extrait EtOAc de la partie aérienne d'*E. nebrodensis*, respectivement.
- **Groupes E (E1, E2)**: reçoit 200 mg/kg et 400 mg/kg l'extrait (AQ) de partie la aérienne d'*E. nebrodensis*, respectivement.

II.9. Activité analgésique

L'activité antalgique vis à vis de la douleur provoquée par l'acide acétique est évaluée selon la méthode décrite par Koster et al. (1959).

Les souris sont réparties en lots de 6 souris. Le premier lot est utilisé comme témoin et reçoit par voie orale de l'eau distillé et les autres lots reçoivent par voie orale une dose unique de 200 mg, 400 mg /kg des extraits (MeOH, EtOH, EtAce, EA et AQ) où 100 mg/kg d'aspirine comme contrôle positif. Un volume de 10 mL/kg d'acide acétique à 0,6 % est ensuite injecté par voie intra péritonéale. Cette injection induit une sensation de douleur qui se manifeste chez les souris par un mouvement d'étirement des pattes postérieures et de torsion de la musculature dorso-abdominale, appelés crampes abdominales. Après un temps de latence de 5 minutes, le nombre de torsions pour chaque souris est compté chaque 5 minute au cours des 30 minutes après l'injection de l'acide acétique. Le pourcentage d'inhibition de la douleur est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = (M_c - M_t / M_c) \times 100$$

Mc: moyenne du nombre des contorsions des souris du lot non traité. Mt: moyenne du nombre des contorsions des souris du lot traité.

II.10. Analyses statistiques

Les résultats des tests effectués *in vitro* sont exprimés en moyenne \pm SD. Les valeurs d'CI₅₀ sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f (concentrations)]. Les graphes des tests sont effectués par le logiciel Graph Pad. Prism. (Version 5.01 pour Windows).

Les résultats des expériences *in vivo* ont été présentés sous forme de moyenne \pm erreur standard de la moyenne (SEM), La différence entre le contrôle et les différents groupes est déterminée par le test de Student pour les comparaisons simples ou ANOVA univariée suivie du test de Dunnet/Tukey pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification. Dans tous les cas, Les valeurs de $p \leq 0.05$ sont considérées statistiquement significatives.

Résultats
et
Discussion

I. Extraction, dosage des polyphénols, flavonoïdes et taninstotauxdes extraits

Dans la présente étude, nous avons tenté d'élucider le possible effet de différents solvants d'extraction sur les activités biologiques de la partie aérienne d'*E. nebrodensis*.

Le rendement de l'extraction de la plante par quatre solvants (Méthanol 85%, Ethanol 70%, Ethanol :acétone, Acétate d'éthyle et de l'eau) est représenté dans le Tableau 8. Les résultats montrent que le rendement d'extraction le plus élevé a été obtenu par extraction en éthanol et méthanol, étaient de 18 à 17% suivie par la décoction 13%, et enfin Ethanol :acétone 11%. selon (Goli et *al.*, 2004) le rendement d'extraction dépend du solvant et de la méthode d'extraction. Sun et Ho (2005) ont signalé que l'eau et les mélanges aqueux d'éthanol, de méthanol et d'acétone sont couramment utilisés dans l'extraction des plantes. Différents systèmes de solvants qui ont été utilisés pour l'extraction des polyphénols proviennent de matières végétales (Pinelo et *al.*, 2004). Cependant, il est difficile de comparer nos résultats avec ceux de la bibliographie car les conditions d'extraction appliquées étaient différentes, notamment la température, la durée d'extraction et le rapport solide/liquide (Santos et *al.*, 2011).

La quantité totale de composés phénoliques varie selon les différents extraits et elle est entre 238,44 et 135,11 μg EAG/mg d'extrait (Tableau 8). La teneur en composés phénoliques (TCP) la plus élevée a été trouvée dans la plante lorsqu'elle a été extraite avec de l'acétate d'éthyle ($238,44 \pm 1,50$ μg EAG /mg), suivi par l'Ethanol : acétone ($214,14 \pm 0,73$ μg EAG /mg d'extrait) et enfin du méthanol à 85% et de l'éthanol à 70% ($185,96 \pm 2,18$ et $135,11 \pm 0,46$ μg EAG /mg d'extrait), respectivement. Pour la décoction sa teneur en polyphénols est de ($138,509 \pm 0,91$ μg EAG /mg d'extrait). D'après les résultats on constate que la plante *E. nebrodensis* étudiée est très riche en composés phénoliques et le solvant d'extraction a affecté la TCP.

Selon Siddhuraju et Becker (2003) ; Kequan et Liangli (2006) ont montrés que le méthanol et l'éthanol sont les meilleurs solvants pour l'extraction des composés phénoliques des extraits en raison de leur polarité et de leur bonne solubilité pour les polyphénols provenant de matières végétales.

Il est intéressant de comparer la TCP d'*E. nebrodensis* de l'Algérie avec celle d'autres pays. L'*E. alata* Decne de Jordanie, elle contient 16,2 et 11,9 mg EAG/g d'extrait pour les extraits aqueux et méthanolique, respectivement (Jaradat et al., 2015). L'étude de Pirbalout et al. (2013) ont indiqué que le contenu phénolique total de l'extrait d'*E. pachyclada* collecté en Iran était de 45 mg EAG/g en poids sec, ce qui est inférieur par rapport aux TCP d'*E. nebrodensis* de cette étude. En comparaison avec d'autres espèces d'Ephedra, notre étude a montré que *E. nebrodensis* possède un TCP plus élevé (238,448 à 135,115 µg EAG/mg d'extrait) que *E. alata* de Palestine Rimawi et al. (2017).

La teneur en flavonoïdes (TF) dans la partie aérienne d'*E. nebrodensis* a été quantifiée par la méthode trichlorure d'aluminium (AlCl₃). Les résultats montrent que les niveaux de ces composés varient entre 21,12 et 17,22 µg EQ / mg d'extrait comme montre le Tableau 8.

La TF la plus élevée a été remarquée dans l'extrait d'acétate d'éthyle (21,13 ± 0,00 µg EQ /mg d'extrait) supérieur par rapport aux autres extraits (Ethanolique 70 %, Méthanolique 85 % et l'Ethanol : acétone) qui sont leurs teneurs varient entre 17 et 17,4 µg EQ /mg d'extrait. Ces résultats ont démontré que les extraits de la plante *E. nebrodensis* sont riches en flavonoïdes.

La comparaison de TF d'*E. nebrodensis* analysée dans cette étude avec l'Ephedra d'autres pays a révélé que l'Ephedra cultivée en Algérie est plus riche en flavonoïdes que les autres espèces de la même famille. Selon l'étude de Harisaranraj et al. (2009) sur l'*E. vulgaris* d'Inde, les flavonoïdes totaux s'élève à 1,48 ± 0,20 mg/100 g de plante. Une autre étude de Rimawi et al. (2017) sur la TF d'*E. Alata* de Palestine est présentée dans l'ordre suivant éthanol 100 % (19,5 ± 0,4 mg/g de plante) > éthanol à 80 % (9,8 ± 0,1 mg/g de plante) > eau (4,2 ± 0,1 mg/g de plante). La teneur totale en flavonoïdes d'*E. nebrodensis* d'Algérie était plus élevée que celle d'*E. alata* de Palestine. Wang et Helliwell (2001) ont indiqué qu'un mélange hydro-éthanolique était supérieur au méthanol et l'acétone pour l'extraction des flavonoïdes.

La polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) a été utilisée pour mesurer les tanins. Les résultats ont montré que les niveaux des tanins dans les extraits de plante varient de 38,88 à 128,80 µg TAE / mg d'extrait sec. L'extrait EtOAc contient la plus grande quantité de tanins avec une valeur de 128,80 µg TAE / mg d'extrait sec et la plus faible teneur en tanin a été observée dans l'extrait EtOH (Tableau 8).

Tableau 8: Rendement, Teneur en composés phénoliques totaux (TCP), Teneur en flavonoïdes totaux (TF) et teneur en Tanins totaux (TT) des extraits d'*E. nebrodensis*.

| Extraits | R (%) | MASSE (g) | Aspect et couleur | TCP ($\mu\text{g EAG /mg d'extract}$) | TF ($\mu\text{g EQ /mg d'extract}$) | TT ($\mu\text{g EAT /mg d'extract}$) |
|--------------|-------|-----------|-------------------|---|---------------------------------------|--|
| AQ | 13,14 | 6,57 | Poudre doré | 138,51 \pm 0,91 | 12,872 \pm 0,01 | 77,817 \pm 6,43 |
| EtOAc | 17,00 | 5,1 | Poudre marron | 238,45 \pm 1,50 | 21,13 \pm 0,00 | 128,80 \pm 0,89 |
| EtAce | 11,39 | 5,69 | Poudre marron | 214,15 \pm 0,73 | 17,434 \pm 0,001 | 72,06 \pm 3,41 |
| EtOH | 18,12 | 18,12 | Poudre verte | 135,12 \pm 0,46 | 17,063 \pm 0,01 | 38,88 \pm 3,01 |
| MeOH | 17,52 | 17,52 | Poudre verte | 185,96 \pm 2,18 | 17,221 \pm 0,01 | 89,07 \pm 1,57 |

Valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD (n=3). $\mu\text{g EAG /mg}$: microgramme équivalent acide gallique /milligramme d'extract. $\mu\text{g EQ /mg}$: microgramme équivalent quercétine /milligramme d'extract. $\mu\text{g EAT /mg}$: microgramme équivalent acide tannique /milligramme d'extract. AQ: extrait aqueux. EtOAc: extrait acétate éthyle. EtAce : extrait Ethanol :acétone. EtOH: extrait Ethanolique 70%. MeOH : extrait Méthanolique 85%. R: rendement d'extraction en %.

Les tanins sont également des composés importants dans l'Ephedra, qui existent principalement sous forme de condensation. Il a été prouvé que les tanins, principalement les proanthocyanidines, sont présents dans de nombreuses plantes d'Ephedra (*E. przewalskii*, *E. alata*, *E. distachya*, *E. fragilis* et *E. intermedia* ; *E. californica*, *E. nevadensis*, *E. fasciculata*, *E. trifurca*, *E. torreyana*, et *E. viridis*) (Caveney et al., 2001). Actuellement, les tanins condensés de la procyanidine A sont les plus courants dans l'Ephédra (Orejola et al., 2017), contenant des dimères, des trimères, et les tétramères (Zhang et al., 2018).

On signale qu'il n'y a pas des travaux concernant les teneurs en composés phénoliques, en flavonoïdes et en tanins de l'espèce étudiée.

II. Rendement, dosage des polyphénols, flavonoïdes et tanins totaux des Fractions

Pour le pourcentage de rendement des fractions s'est avéré varier de 3,20 à 13,73 %, le pourcentage de rendement le plus élevé a été obtenu dans la fraction *n*-butanol (FB : 13,73 %), suivie par la fraction aqueuse (FA : 11,20 %), (FC ; 9,73 %), (FAE ; 5,80 %) et la fraction de l'hexane (FH ; 3,20 %), respectivement. Comme montre le tableau 9.

Dans cette présente étude le fractionnement par le partage solvant-solvant pour obtenir cinq fractions de polarité progressive (*n*-hexane, chloroforme, acétate d'éthyle, *n*-butanol et eau). La fraction *n*-butanol et la FA ont un rendement nettement supérieur considéré comme le maximum parmi les fractions obtenues. Toutefois, une différence significative entre le pourcentage de rendement de FB et FAE a également été observée (Tableau 9). D'après les résultats obtenus, les fractions les plus polaires donnent le rendement le plus élevé. Une série de résultats similaires a été constatée dans le cas *Codonopsis clematidea* (Bhardwaj et al., 2020) où la fraction polaire (FB) a un rendement maximal que les autres fractions. D'autre part Selon les résultats obtenus par Nsimba et al. (2008), ils ont constaté que la fraction non polaire (FH) du *Chenopodium quinoa* et *Amaranthus cruentus* a un rendement maximal par rapport aux autres fractions.

La présente évaluation des fractions d'*E. nebrodensis* a montré que la teneur en polyphénols variait entre ($17,491 \pm 0,046 - 269,669 \pm 0,031$ µg EAG/mg d'extrait) et la teneur en flavonoïdes variait entre ($22,936 \pm 0,001 - 44,507 \pm 0,003$ µg EQ/mg d'extrait). Les données montrent la présence des teneurs élevés de polyphénols et de flavonoides dans la FAE ($269,669 \pm 0,031$ µg EAG/mg d'extrait ; $44,507 \pm 0,003$ µg EQ/mg d'extrait), suivis par la FA ($153,554 \pm 0,004$ µg EAG/mg d'extrait; $34,226 \pm 0,004$ µg EQ/mg d'extrait), ensuite la FC ($104,420 \pm 0,026$ µg EAG/mg d'extrait; $33,643 \pm 0,046$ µg EQ/mg d'extrait), FB ($29,984 \pm 0,001$ EAG/mg d'extrait; $26,281 \pm 0,002$ µg EQ/mg d'extrait) et à la fin FH ($17,491 \pm 0,049$ µg EAG/mg d'extrait; $22,936 \pm 0,001$ µg EQ/mg d'extrait) et les résultats sont présentés dans le Tableau9.

Les résultats ont également montré que l'FAE contient la plus grande quantité de tanins ($228,487 \pm 1,362$ µg EAT/mg d'extrait), suivi de l'FA ($144,358 \pm 3,082$ µg EAT/mg d'extrait), la FC ($143,917 \pm 0,120$ µg EAT/mg d'extrait), la FB ($135,567 \pm 0,456$ µg EAT/mg d'extrait) et la FH ($50,756 \pm 0,990$ µg EAT/mg d'extrait).

Les phénols sont des constituants majeurs du système végétal qui sont dispersés sous forme de métabolites secondaires, jouant un rôle clé en tant qu'antioxydants, protection contre le stress, croissance des plantes et synthèse des pigments. Aussi les flavonoïdes sont des éléments qui jouent un rôle crucial dans la prévention des systèmes biologiques contre les effets néfastes des processus oxydatifs sur les macro-molécules (Robards et *al.*, 2020 ; Bhattacharya et *al.*, 2010 ; Ghasemzadeh et *al.*, 2011). La variation entre la teneur en polyphénols et en flavonoïdes des différentes fractions peut s'expliquer par la séparation de l'extrait brut à l'aide de différents solvants qui regroupent les principaux phytoconstitués actifs en fonction de leur polarité. Les valeurs les plus élevées en phytoconstitués dans la FAE confirment la présence de composants actifs de polarité moyenne. Une tendance identique a été observée dans le cas d'*Achillea millefolium*, *Foeniculum vulgare* et *Lavandula latifolia* (Parejo et *al.*, 2020) et aussi *Codonopsis clematidea* (Bhardwaj et *al.*, 2020) où la FAE a donné les valeurs les plus élevées en polyphénols par rapport aux autres fractions. De plus, les auteurs ont rapporté une telle relation entre l'effet antioxydant avec la TCP et la TF (Merghem et *al.*, 2020).

Tableau 9: Rendement des fractions, Teneur en composés phénoliques totaux (TCP), Teneur en flavonoïdes totaux (TFT) et teneur en Tanins totaux (TT) de différentes fractions obtenues à partir de l'extrait d'éthanol 70% de la partie aérienne d'*E. nebrodensis*.

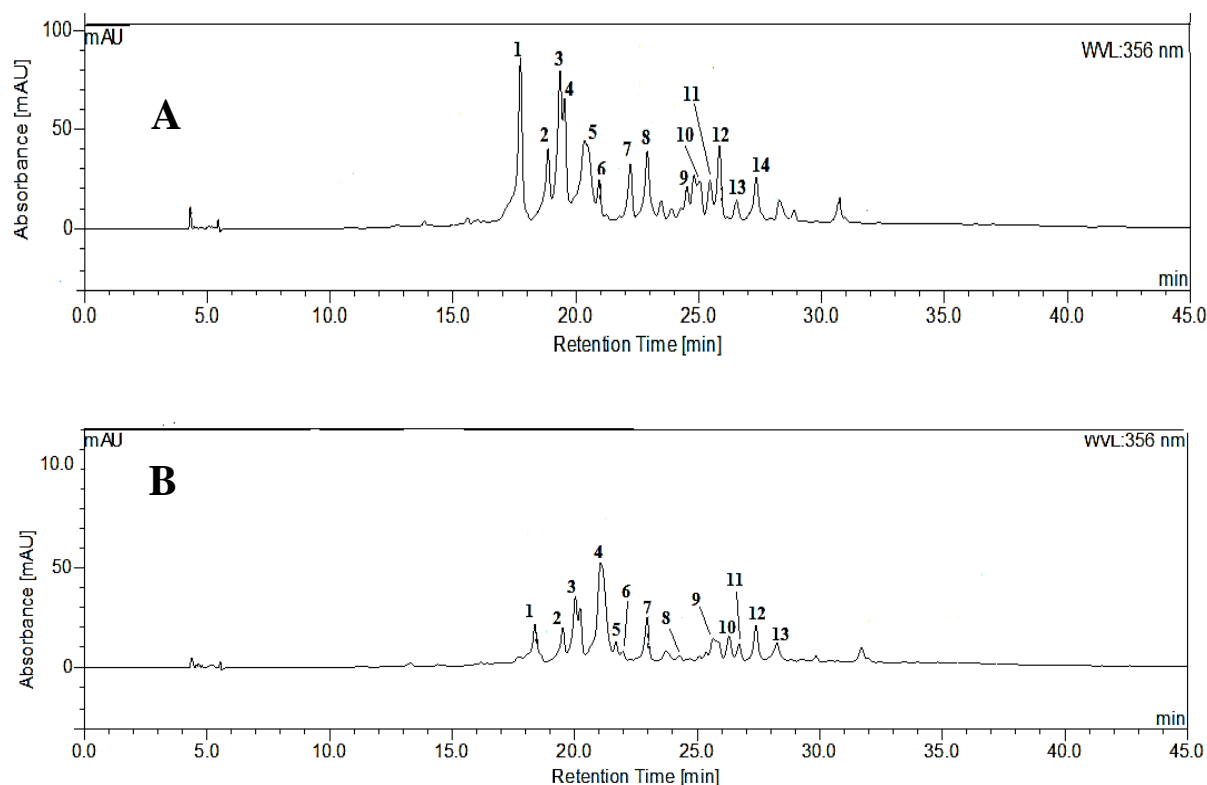
| Fractions | R | TCP | TFT | TT |
|------------|-------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| [0,25mg] | (%) | ($\mu\text{g GAE/mg DE}$) | ($\mu\text{g QE/mg DE}$) | ($\mu\text{g TAE/mg DE}$) |
| FH | 3.20 | 17.491 \pm 0.049 | 22.936 \pm 0.001 | 50.756 \pm 0.990 |
| FC | 9.73 | 104.420 \pm 0.026 | 33.643 \pm 0.046 | 143.917 \pm 0.120 |
| FAE | 5.80 | 269.669 \pm 0.031 | 44.507 \pm 0.003 | 228.487 \pm 1.362 |
| FB | 13.73 | 29.984 \pm 0.001 | 26.281 \pm 0.002 | 135.567 \pm 0.456 |
| FA | 11.20 | 153.554 \pm 0.004 | 34.226 \pm 0.004 | 144.358 \pm 3.082 |

Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm SD de trois mesures consécutives. TCP : Teneur en composés phénoliques totaux. TFC : Teneur en flavonoïdes totaux. TTC : Teneur en tanins totaux. EAG : Équivalent en acide gallique. EQ : Équivalent quercétine. EAT : Équivalent acide tannique. FH : fraction d'hexane ; FC : fraction chloroformique ; FE : fraction d'acétate d'éthyle ; FB : fraction de *n*-butanolique ; FA : fraction aqueuse.

III. Identification des composés actifs dans les extraits d'*Ephedra nebrodensis*

III.1. Identification des composés phénoliques par HPLC-MS

L'identification des métabolites secondaires présents dans les extraits bruts (Ethanol 70%, Méthanol 85%, Ethanol : acétone, acétate d'éthyle et décoction) obtenus à partir de l'espèce *E. nebrodensis* a été réalisée à l'aide du HPLC-DAD-ESI/MS. Les données concernant le temps de rétention (Rt), les longueurs d'onde d'absorption maximale dans la région visible (λ_{\max}), l'ion pseudo-moléculaire [M-H] et les principaux ions fragments de MS des différents composés sont illustrées dans les tableaux 10, 11, 12, 13 et 14. Les spectres UV-Vis et les masse enregistrés ont montré la présence de 19 composés phénoliques, dont cinq flavones glycosides, dix flavonols glycosides et quatre acides phénoliques. Les profils des chromatogrammes HPLC des extraits préparés à partir d'*E. nebrodensis* ont été illustrés dans la Figure 15.



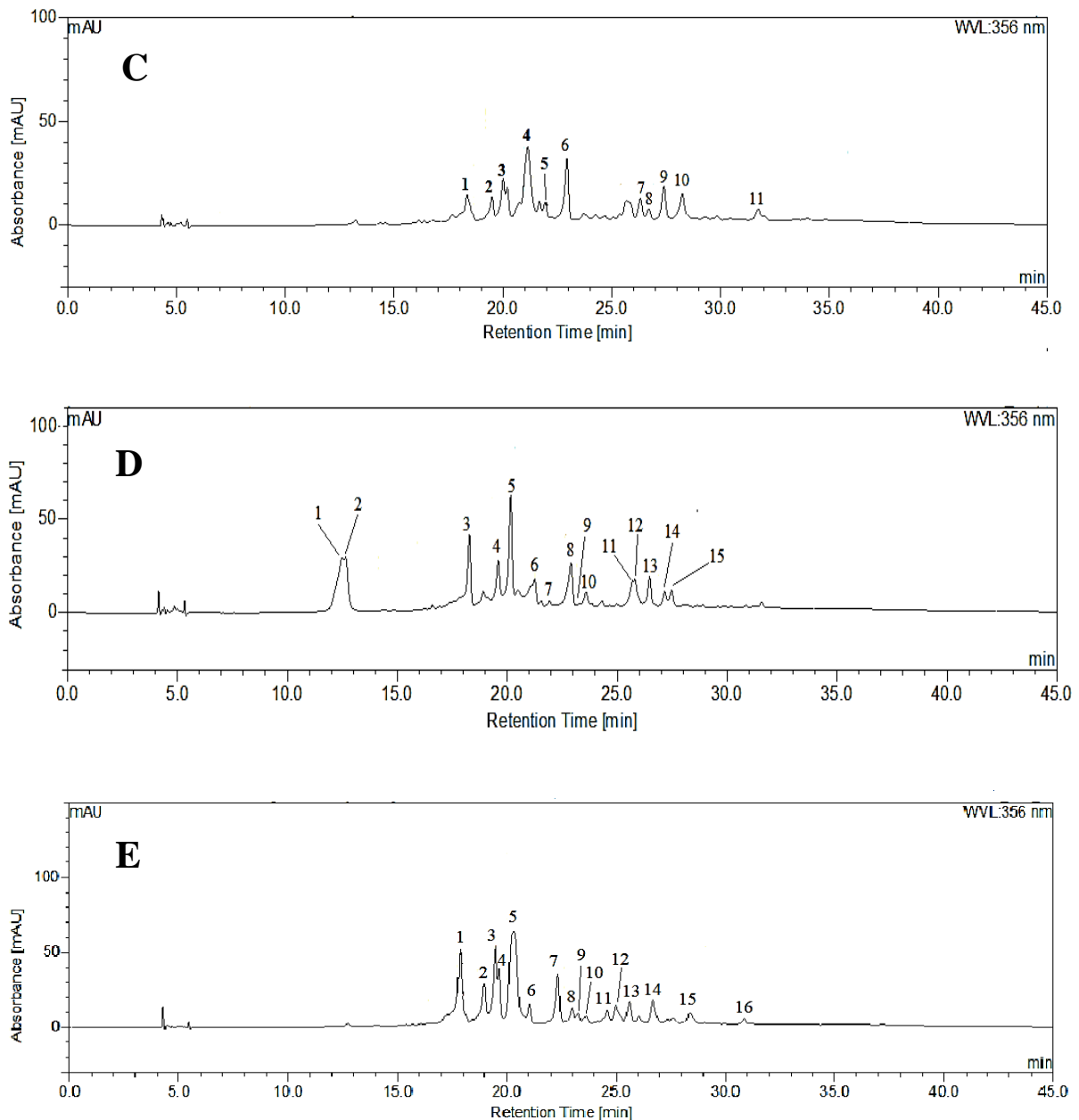


Figure 6: Chromatogrammes HPLC des extraits Methanol 85 % (A), Ethanol 70% (B), Ethanol:acétone (C), Acétate d'éthyle (D) et aqueux (E) d'*E. nebrodensis*, enregistré à 356 nm.

La détermination des différents composés phénoliques dans les extraits bruts préparés à partir de l'espèce *E. nebrodensis* a été réalisée par comparaison des spectres d'absorption UV-Vis et du spectre de masse avec les résultats des données de la littérature ainsi que par comparaison avec des standards commercial. Le composé quercétine-3-*O*-rutinoside avec un ion pseudo-moléculaire négatif $[M-H]^-$ à $609\ m/z$ et $\lambda_{\max} = 352\ nm$ a été identifié dans les extraits MeOH et EtOH, par l'analyse de fragmentation de ses pics. En effet, les spectres de masse de ce composé ont montré un pic intense à $410\ m/z$ $[M-146-34-18]^-$, présentant une perte de la fraction rhamnosyle (146) ainsi que deux groupes hydroxyles (34) et de l'eau (18). Ce

composé a également été confirmé par comparaison avec un étalon commercial et les résultats de l'espèce *E. alata* (Mighri et al., 2019).

Pic avec l'ion moléculaire [M-H]⁻ 623 *m/z* et λ_{\max} = 354 nm, qui a généré deux fragments d'ions dans l'analyse MS : le premier ion fragment à 459 *m/z* [M-164]⁻ correspond à la perte d'une molécule de rhamnose (146) et d'eau (18). Le second ion fragmenté à 285 *m/z* ([M-308-31]⁻), indique la perte de la fraction rutinoside (308) et d'un groupe méthoxyle (31). Le pic a été identifié comme étant l'isorhamnetin-3-*O*-rutinoside dans les extraits MeOH et EA, sur la base de son schéma de fragmentation et des données rapportées par Barros et al. (2011).

Tableau 10: Temps de rétention (TR), longueurs d'onde d'absorption maximale dans la région visible (λ_{\max}), valeur *m/z* des composés phénoliques identifiés dans l'extrait Methanol 85% d'*E. nebrodensis*.

| Pic | TR (min) | λ_{\max} (nm) | [M-H] ⁻ (<i>m/z</i>) | Tentative identification | Nature de composés | Ref | Ion fragments |
|-----|----------|-----------------------|-----------------------------------|--|----------------------|-----|---|
| 1 | 17.75 | 336 | 593 | Apigenin 6- <i>C</i> -glucoside-7- <i>O</i> -glucoside | Flavone glucoside | [1] | 593 (100) |
| 2 | 18.87 | 237 | 423 | Unidentified | - | - | 137 (15) 289 (19) 378 (32) 423 (100) 433 (96) 601(49) 683 (15). |
| 3 | 19.35 | 338 | 563 | Apigenin- <i>C</i> -hexoside- <i>O</i> -pentoside | Flavone glucoside | [2] | 391 (12) 563 (100) |
| 4 | 19.54 | 336 | 563 | Apigenin- <i>C</i> -hexoside- <i>O</i> -pentoside | Flavone glucoside | [2] | 288(13) 325 (35) 453 (52) 563 (100) 675 (22) |
| 5 | 20.35 | 352 | 609 | Quercetin 3- <i>O</i> -rutinoside | Flavonol rutinoside | [1] | 381 (72) 410 (93) 551 (33) 609 (100) 645 (42) 814 (51) |
| 6 | 20.95 | 328 | 407 | Unidentified | - | - | 315 (24); 372 (49) 407 (100) 514 (15) 606 (24) 723 (15) |
| 7 | 22.23 | 320 | 355 | 4- <i>O</i> -caffeoilquinic acid | Phenolic acid | [3] | 355 (44) 391 (100) 401 (100) 468 (10) 711 (60) |
| 8 | 22.93 | 349 | 679 | Unidentified | - | - | 403 (38) 435 (40) 529 (28) 679 (100)787 (12) |
| 9 | 24.82 | 354 | 623 | Isorhamnetin 3- <i>O</i> -rutinoside | Flavonol rutinoside | [1] | 392 (26) 459 (100) 599 (31) 623 (43) 717 (11) |
| 10 | 25.05 | 206 | 507 | Unidentified | - | - | 260 (48) 435 (100) 507 (31) 567 (73) 638 (33) 723 (100) |
| 11 | 25.47 | 352 | 593 | Quercetin - <i>O</i> -dirhamnoside | Flavonol rhamnoside | [1] | 391 (100) 435 (58) 593 (74) 713 (81) |
| 12 | 25.84 | 277 | 385 | Unidentified | - | - | 375 (65) 385 (100) 429 (30) 609 (44) 645 (28) |
| 13 | 26.53 | 349 | 477 | Quercetin glucuronide | Flavonol glucuronide | [4] | 244 (10) 477 (100) 575 (10) 714 (22) |
| 14 | 27.35 | 332 | 463 | Quercetin - <i>O</i> -hexoside | Flavonol glucoside | [5] | 392 (31) 463 (100) 600 (36) 713 (31) |

[1] Barros et al., 2011 ;[2] Zengin et al., 2019 ;[3] Ammar et al., 2018 ; [4] Mullen et al., 2003 ;[5] Bravo et al., 2007.

Dans l'extrait MeOH, le composé 11 (Tableau 10) a été identifié comme quercétine-*O*-dirhamnoside ([M-H]⁻ à 593 *m/z*, λ_{max}= 352), par comparaison avec un standard commercial et des données provenant de recherches antérieures sur l'espèce *Tamus communis* (Barros et al., 2011). Les données spectrales de tous les extraits de *E. nebrodensis*, ont montré la présence des pics avec ([M-H]⁻ à 593 *m/z*, λ_{max}= 336 nm) et ([M-H]⁻ à 563 *m/z*, λ_{max}= 338 nm), caractérisant les deux composés apigénine 6-*C*-glucoside-7-*O*-glucoside et apigénine *C*-hexoside-*O*-pentoside, respectivement. En effet, l'apigénine-*C*-hexoside-*O*-pentoside a été précédemment signalé par Zengin et al. (2019), dans l'extrait éthanolique de *Silvia viridis*. Le principal ion pseudo-moléculaire négatif obtenu à partir de l'apigénine 6-*C*-glucoside-7-*O*-glucoside est 593 *m/z* a donné les principaux ions fragments à 269 *m/z* et 427 amu. La perte de 166 amu est due à un clivage de l'unité glycoside. L'ion à 269 *m/z* est attribué à l'aglycone de l'apigénine. Ce composé a été confirmé par comparaison avec l'étude de Barros et al. (2011) sur *Bryonia dioica*.

Tableau 11: Temps de rétention (TR), longueurs d'onde d'absorption maximale dans la région visible (λ_{max}), valeur *m/z* des composés phénoliques identifiés dans l'extrait Ethanol:acetone d'*E. nebrodensis*.

| Pic | TR (min) | λ _{max} (nm) | [M-H] ⁻ (<i>m/z</i>) | Tentative identification | Nature de composés | Ref | Ion fragments |
|-----|----------|-----------------------|-----------------------------------|--|----------------------|------|---|
| 1 | 18.34 | 335 | 593 | Apigenin 6- <i>C</i> -glucoside-7- <i>O</i> -glucoside | Flavone glucoside | [1] | 209 (17) 326 (17) 417 (41) 593 (100) |
| 2 | 19.48 | 339 | 563 | Apigenin- <i>C</i> -hexoside- <i>O</i> -pentoside | Flavone pentoside | [2] | 335 (11) 433 (27) 563 (100) |
| 3 | 20.19 | 336 | 563 | Apigenin- <i>C</i> -hexoside- <i>O</i> -pentoside | Flavone pentoside | [2] | 325 (70) 450(82) 489 (100) 564 (72) 598 (63) |
| 4 | 21.11 | 352 | 204 | Unidentified | - | - | 204 (98) 409 (100) |
| 5 | 21.92 | 304 | 463 | Myricetin 3- <i>O</i> -rhamnoside | Flavonol rhamnoside | [10] | 401 (18) 463 (100) 628 (15) |
| 6 | 22.93 | 320 | 391 | Caffeic acid derivative | Phenolic acid | [9] | 354 (59) 391 (73) 401 (98) 711 (100) |
| 7 | 26.31 | 328 | 593 | Apigenin 6,8-di- <i>C</i> -glucoside | Flavone glucoside | [11] | 281 (28) 375 (100) 437 (40) 487 (23) 593 (97) 629 (50) 715 (28) |
| 8 | 26.70 | 330 | 355 | 4- <i>O</i> -caffeoylquinic acid | Phenolic acid | [3] | 355 (67) 399 (100) 434 (43) 645 (38) 713 (17) |
| 9 | 27.40 | 354 | 477 | Quercetin glucuronide | Flavonol glucuronide | [4] | 431 (36) 477 (100) 714 (18) |
| 10 | 28.24 | 332 | 463 | Quercetin <i>O</i> -hexoside | Flavonol glucoside | [6] | 463 (89) 499 (100) 589 (34) |
| 11 | 31.42 | 279 | 595 | Unidentified | - | - | 209 (20) 435 (25) 595 (100) 714 (45) |

[1] Barros et al., 2011 ;[2] Zengin et al., 2019 ;[3] Ammar et al., 2018 ; [4] Mullen et al., 2003 ; [6] Pawlowska et al., 2009 ; [9] Rodrigues et al., 2012 ; [10] Riethmüller et al., 2015 ; [11] Martins et al., 2014.

Dans les extraits EtOH et EtAce, nous avons identifié l'acide 4-*O*-caféoylquinique avec ([M-H]⁻ à 353 *m/z* et λ_{\max} : 320-330). En comparaison avec l'étude de Mighri et al. (2019), ils ont signalé la présence de ce composé dans l'extrait d'hydro-méthanolique et ses fractions dérivées de l'espèce *E. alata*. L'extrait EtAce était particulièrement riche en composés phénoliques (Tableau 11). Cependant, la présence de myricétine 3-*O*- rhamnoside ([M-H]⁻ à 463 *m/z* et λ_{\max} = 304 nm a été confirmée en fonction de son temps de rétention, de son spectre UV et de ses caractéristiques de masse par rapport à un étalon authentique. La myricétine 3-*O*- rhamnoside a également été décrite dans l'extrait hydro-éthanolique de la plante *E. alata* de Palestine (Atoui et al., 2005). Dans cet extrait, l'acide caféique avec [M-H]⁻ à 391 *m/z* et λ_{\max} = 320 nm a été élucidé en utilisant un standard commercial et en le comparant avec les données de la littérature (Yang et al., 2012).

Dans l'extrait EtAce, le spectre MS du composé 7 dans le tableau 11 en mode ion négatif a montré un ion précurseur [M - H]⁻ 593 *m/z* qui a produit des pics [(M - H) - à 383 *m/z* (90 + 120)]⁻ et [(M - H) - 487 *m/z* (90 + 17)]⁻, indiquant un schéma de fragmentation typique des flavones di-C-glycoside. Les ions à 375 *m/z* correspondent à l'aglycone d'apigénine (apigénine + 105 amu portant quelques résidus de sucre). Ainsi, ce composé a été provisoirement identifié comme étant l'apigénine-6,8-*C*-diglucoside. Selon les résultats de Martins et al. (2014), ce composé a été précédemment identifié dans l'extrait hydro-alcoolique, l'infusion et la décoction de la plante *Origanum vulgare* L.

Le composé 13 dans l'extrait de MeOH et 9 dans l'extrait de EtAce est un flavonol glycoside, a été identifié comme quercétine glucuronide avec [M-H]⁻ à 477 *m/z* et λ_{\max} : 349-354 nm. La présence d'un pic à 431 *m/z* [(M - H) - 46]⁻ correspondant à une perte d'acide formique (46). Cette constatation est compatible avec les résultats de Mullen et al. (2003). Qui ont détecté ce composé dans l'extrait de fruits de framboise (Mullen et al., 2003). La quercétine-*O*-hexoside a été identifiée dans tous les extraits bruts d'*E. nebrodensis*, par analyse des spectres UV (λ_{\max} : 332-333) et un pic caractéristique dans les spectres de masse ([M-H]⁻ à 463 *m/z*). De plus, ce composé a été trouvé dans la plante *Ilex paraguariensis* (Bravo et al., 2007).

Les pics 10 et 12 dans les extraits EtOH et EA (Tableaux 12 et 13), respectivement, ont été élucidés comme kaempférol *O*-hexosyl-*O*-hexoside ([M-H]⁻ à 609 *m/z* et λ_{\max} = 332 nm), en comparaison avec un standard commercial et les résultats de l'espèce *Cistus ladanifer* (Barros et al., 2013). Les deux flavonols glucosides quercétine-*O*-rhamnoside-*O*-hexoside ([M-H]⁻ 609 *m/z* et λ_{\max} = 352 nm) et le kaempférol 3-*O*-rutinoside ([M-H]⁻ à 593 *m/z* et λ_{\max} = 343

nm), détectés dans l'extrait EtOH ont été déterminés sur la base des études de Barros et *al.* (2011) et Pawlowska et *al.* (2009), respectivement. En outre, la quercétine-*O*-rhamnoside-*O*-hexoside a été décrite dans l'espèce *Cistus ladanifer* (Barros et *al.* 2011). Et le kaempférol 3-*O*-rutinoside a été signalé dans les fruits de *Zizyphus jujuba* L. et *Zizyphus spina-christi* (L.) par Pawlowska et *al.* (2009). En outre, le kaempférol 3-*O*-rhamnoside ([M-H]⁻ à 431 *m/z* et λ_{\max} = 342 nm) a été identifié dans des extraits EtOH et EA en comparaison avec un standard authentique et les données de Bravo et *al.* (2007) dans un échantillon d'extraits de mate.

Tableau 12: Temps de rétention (TR), longueurs d'onde d'absorption maximale dans la région visible (λ_{\max}), valeur *m/z* des composés phénoliques identifiés dans l'extrait Ethanol 70% d'*E. nebrodensis*.

| Pic | TR (min) | λ_{\max} (nm) | [M-H] ⁻ (<i>m/z</i>) | Tentative identification | Nature de composés | Ref | Ion fragments |
|-----|----------|-----------------------|-----------------------------------|--|---------------------|-----|---|
| 1 | 18.36 | 336 | 593 | Apigenin 6- <i>C</i> -glucoside-7- <i>O</i> -glucoside | Flavone glucoside | [1] | 427 (20) 593 (100) |
| 2 | 19.50 | 336 | 563 | Apigenin- <i>C</i> -hexoside- <i>O</i> -pentoside | Flavone glucoside | [2] | 433 (38) 563 (100) |
| 3 | 20.01 | 338 | 563 | Apigenin- <i>C</i> -hexoside- <i>O</i> -pentoside | Flavone glucoside | [2] | 351 (22) 487 (40) 563 (100) |
| 4 | 21.04 | 352 | 609 | Quercetin- <i>O</i> -rhamnoside- <i>O</i> -hexoside | Flavonol glucoside | [1] | 204 (64) 302 (9) 409 (100) 609 (13) |
| 5 | 21.95 | 332 | 463 | Quercetin- <i>O</i> -hexoside | Flavonol glucoside | [5] | 463(100) |
| 6 | 22.96 | 320 | 393 | Unidentified | - | - | 355 (48) 393 (87) 401 (100) 445 (26) 711 (96) |
| 7 | 24.27 | 358 | 609 | Quercetin 3- <i>O</i> -rutinoside | Flavonol rutinoside | [1] | 371 (100) 439 (16) 609 (41) |
| 8 | 25.65 | 207 | 338 | Unidentified | - | - | 261 (50) 369 (100) 429 (34) 624 (47) 713 (68) |
| 9 | 26.30 | 343 | 593 | Kaempferol 3- <i>O</i> -rutinoside | Flavonol rutinoside | [6] | 215 (16) 322 (19) 429 (79) 459 (100) 593 (70) 659 (44) 715 (51) |
| 10 | 26.71 | 332 | 609.1 | Kaempferol <i>O</i> -hexosyl- <i>O</i> -hexoside | Flavonol glucoside | [7] | 355 (62) 399 (100) 434 (62) 609 (65) 723 (27) |
| 11 | 27.40 | 339 | 477 | 6-Hydroxyluteolin-7- <i>O</i> -glucuronide acid | Flavone glucuronide | [8] | 477 (100) 513 (43) |
| 12 | 28.25 | 274 | 499 | Caffeoyl coumaroylquinic acid | Phenolic acid | [9] | 379 (36) 463 (100) 499 (20) 577 (23) 724 (23) |
| 13 | 31.70 | 342 | 431 | Kaempferol 3- <i>O</i> - rhamnoside | Flavonol rhamnoside | [5] | 215 (15) 431 (82) 467 (100) 714 (20) |

[1] Barros et *al.*, 2011 ;[2] Zengin et *al.*, 2019 ;[5] Bravo et *al.*, 2007 ; [6] Pawlowska et *al.*, 2009 ; [7] Barros et *al.*, 2013 ; [8] Liu et *al.*, 2011 ; [9] Rodrigues et *al.*, 2012.

Deux autres composés phénoliques ont été identifiés dans l'extrait EtOH (pic 11 et 12 dans le tableau 10). Le composé 11 présentait un pic d'ion moléculaire ([M - H]⁻ à 477 *m/z* et un fragment fille à 431 *m/z* correspondant à une perte d'acide formique (46 amu) de la fraction glucuronique (176). La structure de ce composé a été confirmée comme étant le 6-Hydroxyluteolin-7-*O*-glucuronide par la recherche bibliographique fournie par Liu et *al.* (2011). Le pic 12, ce composé a été élucidé sous forme d'acide caféoyl coumaroylquinique

([M-H]⁻ à 499 *m/z*, λ_{\max} = 274 nm), comparé à l'article de Rodrigues et al. (2012). Comme le montre le tableau 13, le composé 7 a été identifié comme étant la lutéoline-Me-glycoside ([M-H]⁻ à 463 *m/z* et λ_{\max} = 330 nm), à partir duquel Atoui et al. (2005) ont identifié ce composé positivement ([M+H]⁺ à 465 *m/z*, λ_{\max} : 338 nm) dans l'infusion de *dictamnus*. De plus, le composé 8 a été déterminé comme étant du Feruloyl hexose avec ([M-H]⁻ à 355 *m/z*, λ_{\max} = 319 nm). Un composé ayant des caractéristiques chromatographiques et spectrales similaires a été trouvé par Zengin et al. (2019) dans l'extraction assistée par micro-ondes (MAE) des racines de *Salvia viridis*.

Tableau 13: Temps de rétention (TR), longueurs d'onde d'absorption maximale dans la région visible (λ_{\max}), valeur *m/z* des composés phénoliques identifiés dans l'extrait acétate d'éthyle d'*E. nebrodensis*.

| Pic | TR (min) | λ_{\max} (nm) | [M-H] ⁻ (<i>m/z</i>) | Tentative identification | Nature de composés | Ref | Ion fragments |
|-----|----------|-----------------------|-----------------------------------|--|----------------------|------|---|
| 1 | 12.49 | 350 | 417 | Kaempferol 3- <i>O</i> -arabinoside | Flavonol arabinoside | [3] | 204 (39) 348 (39) 387 (100) 417 (94) 524 (45) 672 (41) 813 (35) |
| 2 | 12.65 | 352 | 204 | Unidentified | - | - | 204 (100) 293 (20) 451 (39) 547 (22) |
| 3 | 18.28 | 340 | 593 | Apigenin 6- <i>C</i> -glucoside-7- <i>O</i> -glucoside | Flavone glucoside | [1] | 356 (9) 593(100) |
| 4 | 19.59 | 336 | 563 | Apigenin- <i>C</i> -hexoside- <i>O</i> -pentoside | Flavone pentoside | [2] | 335 (33) 435 (33) 563 (100) |
| 5 | 20.16 | 337 | 563 | Apigenin- <i>C</i> -hexoside- <i>O</i> -pentoside | Flavone pentoside | [2] | 370 (7) 563 (100) |
| 6 | 21.24 | 270 | 451 | Unidentified | - | - | 451 (24) 497 (100) 565 (27) 609 (91) |
| 7 | 21.92 | 330 | 463 | Luteolin Me-glycoside | Flavone glucoside | [12] | 227 (13) 387(51) 463 (100) 487 (93) 599 (36) 687 (13) 797 (36) |
| 8 | 22.90 | 319 | 355 | Feruloyl hexose | Hydroxycinnamic acid | [2] | 355 (21) 401(100) 711 (11) |
| 9 | 23.20 | 367 | 431 | Kaempferol 3- <i>O</i> -rhamnoside | Flavonol rhamnoside | [5] | 431 (100) 487 (19) |
| 10 | 23.58 | 223 | 649 | Unidentified | - | - | 363 (25) 431 (100) 500 (20) 649 (30) 808 (25) |
| 11 | 25.70 | 354 | 623 | Isorhamnetin-3- <i>O</i> -rutinoside | Flavonol rutinoside | [1] | 173 (39) 297(27) 385 (20) 507 (15) 568 (63) 623 (100)723 (27) |
| 12 | 25.80 | 332 | 609 | Kaempferol <i>O</i> -hexosyl- <i>O</i> -hexoside | Flavonol glucoside | [7] | 173 (52) 296 (35) 477 (37) 609 (100) 724 (65) |
| 13 | 26.47 | 353 | 593 | Kaempferol- <i>O</i> -rhamnoside- <i>O</i> -hexoside | Flavonol glucoside | [7] | 295 (19) 387 (17) 593 (100) |
| 14 | 27.16 | 328 | 477 | Unidentified | - | - | 401 (23) 477 (100) 500 (35) |
| 15 | 27.47 | 333 | 463 | Quercetin <i>O</i> -hexoside | Flavonol glucoside | [5] | 463 (100) 593 (5) 718 (7) |

[1] Barros et al., 2011 ;[2] Zengin et al., 2019 ;[3] Ammar et al., 2018 ; [5] Bravo et al., 2007 ; [7] Barros et al., 2013 ; [12] Atoui et al., 2005.

L'analyse HPLC-MS de l'extrait (AQ) d'*E.nebrodensis* montre la présence des composés phénoliques. Il s'agit de 3 acides phénoliques identifiés qui correspond à acide *p*-Coumaric

hexoside, acide 4-*O*-caffeoylquinic et 5-hydroxy feruoyl hexose qui sont des acides hydrocinnamiques, le composé majoritaire dans ces composés phénolique c'était 4-*O*-caffeoylquinic avec pseudo moléculaire ([M-H]⁻ à 355 *m/z*, λ_{max} : 320) (Tableau 14).

Il faut signaler que l'extrait (AQ) est riche en flavonoïdes, on note 3 Flavones glucosides qui sont apigenin 6-*C*-glucoside-7-*O*-glucoside, apigenin-*C*-hexoside-*O*-pentoside qui est le plus abondant avec pseudo-ion moléculaire [M-H]⁻ à 563 *m/z* et Apigenin-7-*O*- glucoside, ces formes d'apigenin glucosidique sont caractérisées par (λ_{max} : 335-340). 3 flavonols glucosides identifiés dans cet extrait sont isorhamnetin 3-*O*-rutinoside ([M-H]⁻ à 623 *m/z*, λ_{max} : 354), kaempferol-3-*O*-rutinoside ([M-H]⁻ à 593 *m/z*, λ_{max} : 345), quercetin glucuronide ([M-H]⁻ à 477 *m/z*, λ_{max} : 360) qui correspond aux pics 12,13 et 14, respectivement dans la figure (15.E).

Tableau 14: Temps de rétention (TR), longueurs d'onde d'absorption maximale dans la région visible (λ_{max}), valeur *m/z* des composés phénoliques identifiés dans l'extrait (AQ) d'*E. nebrodensis*.

| Pic | TR (min) | λ _{max} (nm) | Valeurs [M-H] ⁻ (<i>m/z</i>) | Tentative identification | Nature de composés | Ref | Ion fragments |
|-----|----------|-----------------------|---|--|-----------------------|------|--|
| 1 | 17.85 | 335 | 593 | Apigenin 6- <i>C</i> -glucoside-7- <i>O</i> -glucoside | Flavone glucoside | [2] | 593 (100) |
| 2 | 18.97 | 337 | 563 | Apigenin- <i>C</i> -hexoside- <i>O</i> -pentoside | Flavone pentoside | [2] | 423 (88) 563 (100) |
| 3 | 19.47 | 338 | 563 | Apigenin- <i>C</i> -hexoside- <i>O</i> -pentoside | Flavone pentoside | [2] | 349 (14) 563 (100) 631 (16) |
| 4 | 19.65 | 337 | 563 | Apigenin- <i>C</i> -hexoside- <i>O</i> -pentoside | Flavone pentoside | [2] | 393 (18) 451(45) 488 (11) 563 (100) 925 (20) |
| 5 | 20.17 | 257 | 325 | <i>p</i> - Coumaric acid hexoside | Hydroxycinnamic acids | [13] | 325 (38) 371 (68) 409 (100) 530 (75) 651 (95) |
| 6 | 21.06 | 329 | 487 | Unidentified | - | - | 371 (31) 407 (100) 487 (49) 597 (18) |
| 7 | 22.35 | 320 | 355 | 4- <i>O</i> -caffeoylquinic acid | Phenolic acid | [3] | 355 (43) 401 (100) 711 (60) |
| 8 | 22.98 | 354 | 679 | Unidentified | - | - | 445 (28) 617 (15) 679 (100) 737 (18) |
| 9 | 23.27 | 332 | 371 | 5-Hydroxy feruoyl hexose | Hydroxycinnamic acids | [14] | 189 (18) 277 (23) 371 (100) 490 (38) 595 (23) 714 (15) |
| 10 | 23.61 | 257 | 609 | Unidentified | - | - | 356 (20) 487 (37) 609 (70) 645 (20) 723 (100) |
| 11 | 24.62 | 337 | 714 | Unidentified | - | - | 403(17) 487 (19) 649 (12) 714 (100) |
| 12 | 24.97 | 354 | 623 | Isorhamnetin 3- <i>O</i> -rutinoside | Flavonol rutinoside | [1] | 261 (33) 431 (13) 623 (100) 659 (48) 723 (22) |
| 13 | 25.61 | 345 | 593 | Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinoside | Flavonol rutinoside | [6] | 281 (12) 387 (15) 593 (39) 713 (100) |
| 14 | 26.69 | 360 | 477 | Quercetin glucuronide | Flavonol glucuronide | [4] | 440 (24) 477 (100) 513 (44) 715 (12) |
| 15 | 28.36 | 346 | 218 | Unidentified | - | - | 218 (200) 437 (38) 471 (10) |
| 16 | 30.86 | 340 | 431 | Apigenin-7- <i>O</i> - glucoside | Flavone glucoside | [12] | 431 (100) 465 (91) 563 (31) |

[1] Barros et al., 2011 ;[2] Zengin et al., 2019 ;[3] Ammar et al 2018; [4] Mullen et al., 2003 ; [6] Pawlowska et al 2009 ;[12] Atoui et al., 2005 ;[13] Mekky et al., 2019 ; [14] ; Álvarez-Fernández et al., 2014.

Les flavonoïdes sont la classe la plus courante de métabolites secondaires au sein de genre *Ephedra*, en comparaison avec les flavonoïdes identifiés dans cette espèce, on trouve plus de quarante flavonoïdes qui ont été identifiés. Parmi les flavonols identifiés sont : kaempferol et quercetin dans les racines d'*E. sinica* (Tao et al., 2011), rutin et quercetin-3-*O*-glucoside dans *E. campylopoda* (Kasahara et al., 1983), kaempférol 3-*O*-rhamnoside 7-*O*-glucoside et kaempférol 3-*O*-glucoside 7-*O*-rhamnoside dans *E. sinica* (Amakura et al., 2013). kaempférol 3-*O*-rhamnoside et quercétine 3-*O*-rhamnoside dans *E. alata* (Nawwar et al., 1984).

Pour les flavones et leurs glycosides: apigénine et luteoline identifiés dans *E. sinica* (Porter et Wallace, 1988 ; Tao et al., 2011), apigénine-5-rhamnoside dans *E. sinica* (Purev et al., 1988), Apigénine-7-*O*-glucoside dans *E. campylopoda* (Kasahara et al., 1983), vitexin et isovitexin-2''-*O*-rhamnoside dans *E. sinica* (Amakura et al., 2013). Ainsi que flavonols et leurs composants 3-*O*-glycosides, sont les plus flavonoïdes communs dans l'éphédra. Les fractions sucrées de ces glycosides flavonoïdes sont généralement constitués de glucose et de rhamnose. Autrefois, on croyait que la plupart des flavonoïdes dans le genre étaient des dérivés du flavonol aglycones kaempferol, ou de la quercétine. Récemment, d'autres aglycones tels que l'apigénine, la catéchine et la lutéoline ont été caractérisés. La plupart des flavonoïdes glycosides sont des mono-glycosides ou des di-glycosides. En outre, trois glycosides et quatre glycosides sont également présents (Zhang et al., 2018).

Trois composés phénoliques glycosidiques sont isolés d'*E. nebrodensis*, Nebrodenside A, Nebrodenside B et *O*-coumaric acide glucoside (Ballero et al., 2010 ; Cottiglia et al., 2005). Et de quatre acides phénoliques (Acide *p*- coumarique, Acide *p*- hydroxybenzoïque, Acide protocatéchuique, Acide vanillique) (Chumbalov et al., 1977) sont isolés d'*E. equisetina*. Certains autres composés phénoliques qui ont été isolés à partir des tiges d'*E. sinica* sont l'acide *trans*-cinnamique, l'acide caféique, l'acide chlorogénique et un nouveau glycoside de l'acide phénylpropionique (Zhao et al., 2009), tandis que l'acide 2-hydroxyl5-méthoxybenzoïque et l'acide iso-férulique sont également isolés des racines d'*E. sinica* (Tao et al., 2010).

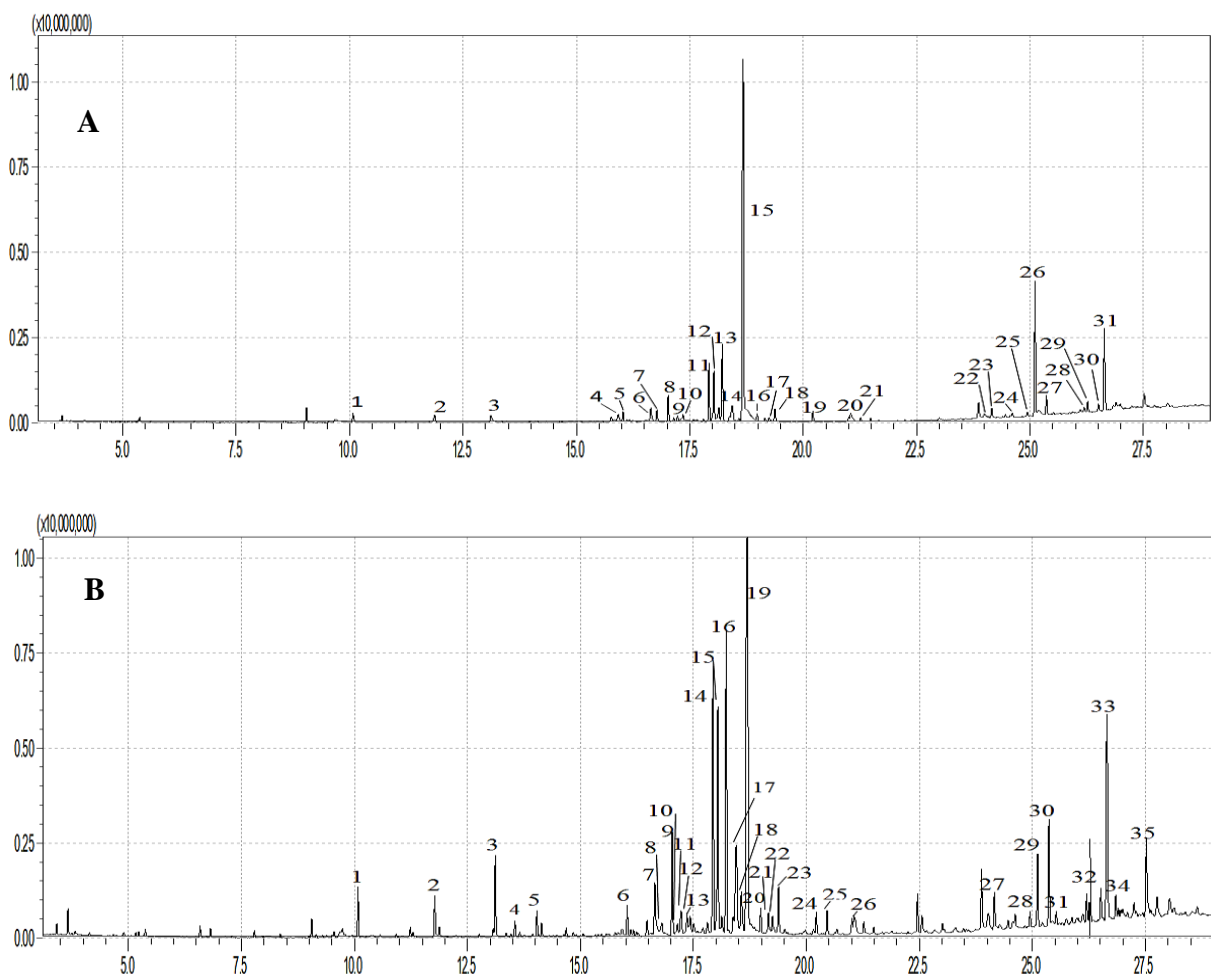
III.2. Identification des alcaloïdes par CPG-MS

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-MS) a également été utilisée pour l'identification des composés phytochimiques après silylation. L'analyse des composés non volatils et thermolabiles par CPG-MS présuppose leur conversion en dérivés volatils et thermotolérants (Proestos et al., 2006). La silylation est une

procédure idéale pour l'analyse CPG des composés non volatils et thermolabiles. Par rapport à leur composémère, les dérivés TMS (triméthylsilyle) sont plus volatils, moins polaires et plus thermotolérants. Dans la silylation, un hydrogène actif dans -OH, -COOH, =NH, -NH₂ ou -SH est remplacé par un groupe triméthylsilyle. La silylation est une réaction de substitution nucléophile. Elle est considérée comme une attaque nucléophile sur l'atome de silicium du donneur de silyle, produisant un état de transition bimoléculaire. Le groupe silyle sortant du composé doit être de faible basicité et capable de stabiliser une charge négative dans l'état de transition (Chu et *al.*, 2001).

Les résultats de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse (CPG-MS) ont révélé la présence de divers composés présents dans les extraits bruts d'*E. nebrodensis*.

Dans la figure 16, l'analyse des extraits a montré la présence de 31 à 36 pics qui ont été identifiés, tandis que cette identification est réalisée par une base des données de la bibliothèque du NIST14.



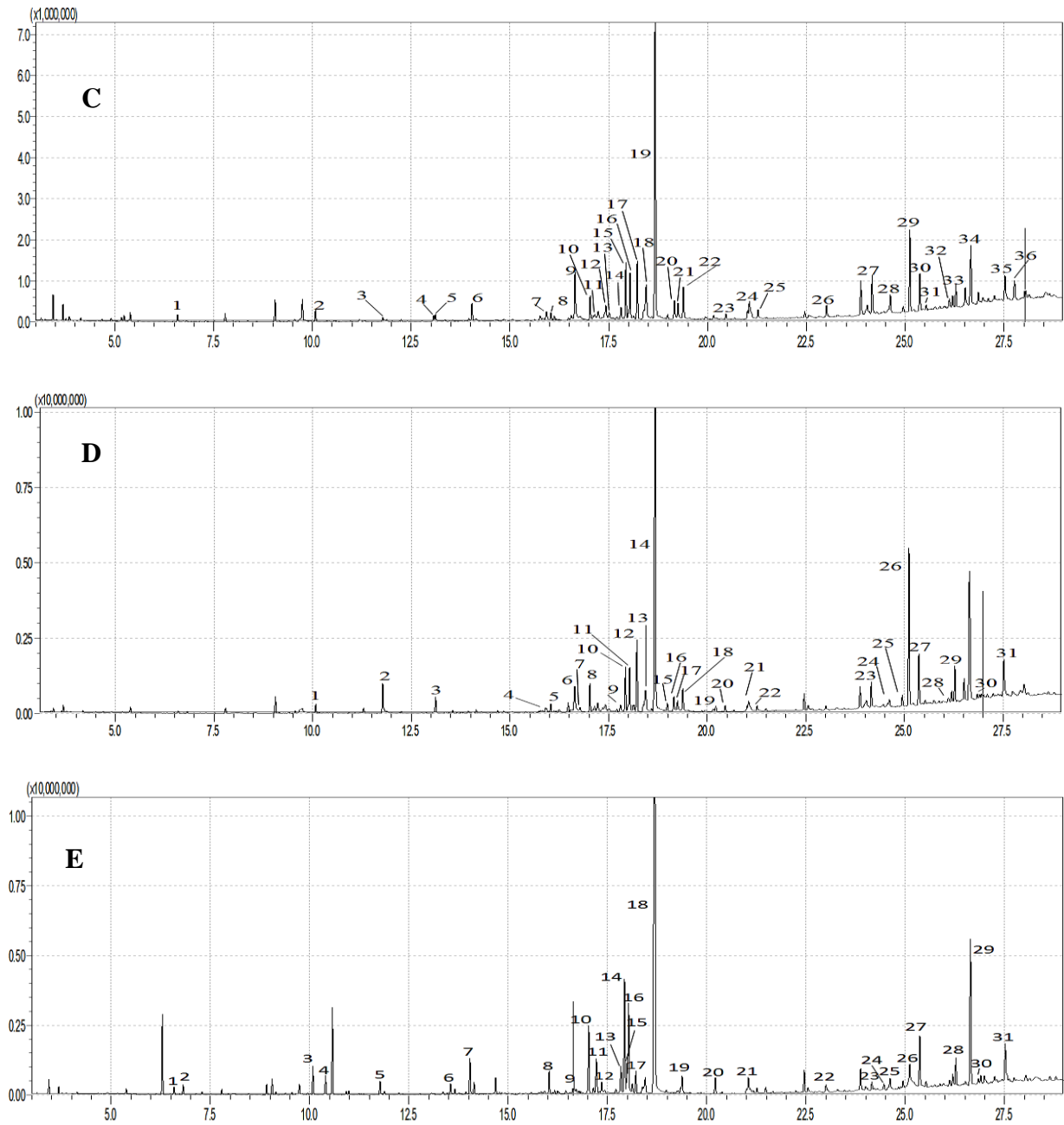


Figure 7: Chromatogrammes CPG-MS des composés dérivés dans les extraits Methanol 85 % (A), Ethanol 70% (B), Ethanol:acétone (C), Acétate d'éthyle (D) et aqueux (E) d'*E. nebrodensis*.

Les sucres présentent les principaux composés dans tous les extraits comme (D-(-)-Tagatofuranose, D-(-)-Fructofuranose, D-Allose, D-fructose, D-glucitol, 3- α -mannobiose, Melibiose, Maltose, Sucrose et D-Trehalose, D-lactitol). Selon Xia et al. (2011) l'*E. sinica* contient une quantité élevée en polysaccharides, qui représentent entre 3 et 5 % du poids total de la plante.

Tableau 15: Composition chimique de l'extrait Methanol 85% d'*E. nebrodensis* déterminée par CPG-MS.

| Pic | TR | AP % | IK cal | IK lit | Composés, TMS | PM | Formule chimique | % de Probabilité |
|-----|-------|-------|--------|--------|---|-----|---|------------------|
| 1 | 10.07 | 0.70 | 1244 | 1274 | Glycerol, 3TMS derivative | 308 | C ₁₂ H ₃₂ O ₃ SI | 96 |
| 2 | 11.87 | 0.74 | 1405 | 1360 | D-Pseudoephedrine, TMS derivative | 237 | C ₁₃ H ₂₃ NOSI | 85 |
| 3 | 13.11 | 0.79 | 1451 | 1483 | Malic acid, 3TMS derivative | 350 | C ₁₃ H ₃₀ O ₅ SI | 94 |
| 4 | 15.92 | 0.90 | 1665 | 1724 | Levoglucosan, 3TMS derivative | 378 | C ₁₅ H ₃₄ O ₅ SI | 85 |
| 5 | 16.02 | 0.78 | 1669 | 1742 | Xylitol, 5TMS derivative | 512 | C ₂₀ H ₅₂ O ₅ SI | 95 |
| 6 | 16.64 | 1.37 | 1695 | 1666 | Arabinofuranose, 1,2,3,5-tetrakis-O-(TMS)- | 438 | C ₁₇ H ₄₂ O ₅ SI | 88 |
| 7 | 16.77 | 0.84 | 1801 | 1801 | D-(-)-Tagatofuranose, pentakis(TMS) ether (isomer 2) | 540 | C ₂₁ H ₅₂ O ₆ SI | 81 |
| 8 | 17.02 | 1.80 | 1812 | 1822 | Shikimic acid (4TMS) | 462 | C ₁₉ H ₄₂ O ₅ SI | 94 |
| 9 | 17.14 | 0.34 | 1818 | 1839 | D-(-)-Fructofuranose, pentakis(TMS) ether (isomer 1) | 540 | C ₂₁ H ₅₂ O ₆ SI | 86 |
| 10 | 17.23 | 0.40 | 1822 | 1839 | D-(-)-Fructofuranose, pentakis(TMS) ether (isomer 2) | 540 | C ₂₁ H ₅₂ O ₆ SI | 88 |
| 11 | 17.92 | 3.89 | 1854 | 1847 | D-Fructose, 1,3,4,5,6-pentakis-O-(TMS)-, O-methyloxime | 569 | C ₂₂ H ₅₅ NO ₆ | 93 |
| 12 | 18.02 | 3.72 | 1859 | 1847 | D-Fructose, 1,3,4,5,6-pentakis-O-(TMS)-, O-methyloxime | 569 | C ₂₂ H ₅₅ NO ₆ | 92 |
| 13 | 18.21 | 5.56 | 1868 | 1882 | D-Allose, pentakis(TMS) ether, methyloxime (syn) | 569 | C ₂₂ H ₅₅ NO ₆ | 92 |
| 14 | 18.42 | 1.90 | 1878 | 1882 | D-Allose, pentakis(TMS) ether, methyloxime (syn) | 569 | C ₂₂ H ₅₅ NO ₆ | 93 |
| 15 | 18.67 | 35.63 | 1890 | 1864 | D-Glucitol, 6TMS derivative | 614 | C ₂₄ H ₆₂ O ₆ SI | 95 |
| 16 | 18.98 | 0.53 | 2005 | 1933 | .beta.-D-Glucopyranose, 5TMS derivative | 540 | C ₂₁ H ₅₂ O ₆ SI | 97 |
| 17 | 19.28 | 0.30 | 2018 | | Epigallocatechin (6TMS) | 738 | C ₃₃ H ₆₂ O ₇ SI | 76 |
| 18 | 19.37 | 1.07 | 2025 | 2042 | Palmitic Acid, TMS derivative | 328 | C ₁₉ H ₄₀ O ₂ SI | 95 |
| 19 | 20.21 | 0.73 | 2067 | 2076 | Myo-Inositol, 6TMS derivative | 612 | C ₂₄ H ₆₀ O ₆ SI | 93 |
| 20 | 21.04 | 1.03 | 2211 | 2175 | 9-Octadecenoic acid, (E)-, TMS derivative | 354 | C ₂₁ H ₄₂ O ₂ SI | 96 |
| 21 | 21.26 | 0.24 | 2223 | 2239 | Stearic acid, TMS derivative | 356 | C ₂₁ H ₄₄ O ₂ SI | 95 |
| 22 | 23.99 | 0.74 | 2482 | 2815 | Melibiose, octakis(TMS)- | 918 | C ₃₆ H ₈₆ O ₁₁ | 82 |
| 23 | 24.15 | 0.73 | 2492 | 2568 | 3-.alpha.-Mannobiose, octakis(TMS) ether (isomer 2) | 918 | C ₃₆ H ₈₆ O ₁₁ | 82 |
| 24 | 24.61 | 0.25 | 2621 | 2644 | Behenic acid, TMS derivative | 412 | C ₂₅ H ₅₂ O ₂ SI | 93 |
| 25 | 24.94 | 0.34 | 2643 | 2721 | Maltose, octakis(TMS) ether, methyloxime (isomer 2) | 947 | C ₃₇ H ₈₉ NO ₁ | 82 |
| 26 | 25.11 | 9.91 | 2654 | 2622 | Sucrose, 8TMS derivative | 918 | C ₃₆ H ₈₆ O ₁₁ | 97 |
| 27 | 25.36 | 1.55 | 2670 | 2622 | Sucrose, 8TMS derivative | 918 | C ₃₆ H ₈₆ O ₁₁ | 84 |
| 28 | 25.93 | 0.32 | 2808 | 2816 | D-(+)-Trehalose, octakis(TMS) ether | 918 | C ₃₆ H ₈₆ O ₁₁ | 88 |
| 29 | 26.10 | 0.42 | 2820 | 2820 | Lignoceric acid, TMS derivative | 440 | C ₂₇ H ₅₆ O ₂ SI | 85 |
| 30 | 26.27 | 0.84 | 2832 | 2816 | D-Trehalose, 7TMS derivative | 846 | C ₃₃ H ₇₈ O ₁₁ | 85 |
| 31 | 26.63 | 6.47 | 2857 | 2843 | D-Lactitol, nonakis(TMS) ether | 992 | C ₃₉ H ₉₆ O ₁₁ | 89 |

TMS: trimethylsilyl, **TR:** le temps de rétention (min), **AP:** l'air de pic, **IK_{CAL}** les indices kovats sont déterminés sur une colonne DB-5 en utilisant la série homologue des *n*-alcane, **IK_{LIT}** les indices kovats de littérature, **PM:** poids moléculaire. La présence des acides gras a été signalée dans les extraits d'*E. nebrodensis* (acide palmitique, acide 9-octadécanoïque, acide stéarique et acide béhénique, acide lignocérique), d'acides organiques tels que (l'acide malique), d'alcools (glycérol) et d'autres composés

aromatiques tels que (acide shikimique). Les différents produits identifiés sont présentés dans les tableaux (15, 16, 17, 18 et 19).

Tableau 16: Composition chimique de l'extrait Ethanol 70% d'*E. nebrodensis* déterminée par CPG-MS.

| Pic | TR | AP % | IK cal | IK lit | Composés, TMS | PM | Formule chimique | % de Probabilité |
|-----|--------|-------|--------|--------|--|-----|---|------------------|
| 1 | 10.07 | 1.25 | 1244 | 1274 | Glycerol, 3TMS derivative | 308 | C ₁₂ H ₃₂ O ₃ SI | 90 |
| 2 | 11.77 | 1.21 | 1401 | 1360 | R,R(-)-Pseudoephedrine, TMS ether | 237 | C ₁₃ H ₂₃ NOSI | 98 |
| 3 | 13.11 | 2.06 | 1452 | 1483 | Malic acid, 3TMS derivative | 350 | C ₁₃ H ₃₀ O ₅ SI | 95 |
| 4 | 13.54 | 0.46 | 1468 | 1515 | L-5-Oxoproline, 2TMS derivative | 273 | C ₁₁ H ₂₃ NO ₃ | 95 |
| 5 | 14.03 | 0.67 | 1486 | 1925 | Ephedrine, 2TMS derivative | 309 | C ₁₆ H ₃₁ NOSI | 97 |
| 6 | 16.03 | 0.77 | 1669 | 1742 | Xylitol, 5TMS derivative | 512 | C ₂₀ H ₅₂ O ₅ SI | 95 |
| 7 | 16.64 | 1.98 | 1695 | 1666 | Arabinofuranose, 1,2,3,5-tetrakis-O-(TMS)- | 438 | C ₁₇ H ₄₂ O ₅ SI | 87 |
| 8 | 16.80 | 0.51 | 1802 | 1801 | D-(-)-Tagatofuranose, pentakis(TMS) ether (isomer 2) | 540 | C ₂₁ H ₅₂ O ₆ SI | 83 |
| 9 | 17.02 | 2.69 | 1813 | 1822 | Shikimic acid (4TMS) | 462 | C ₁₉ H ₄₂ O ₅ SI | 94 |
| 10 | 17.14 | 0.35 | 1818 | 1813 | Protocatechoic acid, 3TMS derivative | 370 | C ₁₆ H ₃₀ O ₄ SI | 77 |
| 11 | 17.22 | 0.91 | 1822 | - | Pentaric acid, 2,3-dideoxy-4-O-(TMS)-3-[[[(TMS)oxy]carbonyl]-, bis(TMS) ester | 480 | C ₂₈ H ₄₀ O ₇ SI | 79 |
| 12 | 17.35 | 0.58 | 1828 | 1845 | D-(-)-Fructopyranose, 5TMS derivative (isomer 1) | 540 | C ₂₁ H ₅₂ O ₆ SI | 92 |
| 13 | 17.42 | 0.63 | 1831 | - | 3-Deoxyhexitol, 5TMS derivative | 526 | C ₂₁ H ₅₄ O ₅ SI | 79 |
| 14 | 17.93 | 7.80 | 1855 | 1847 | D-Fructose, 1,3,4,5,6-pentakis-O-(TMS)-, O-methylxime | 569 | C ₂₂ H ₅₅ NO ₆ | 93 |
| 15 | 18.03 | 6.68 | 1860 | 1847 | D-Fructose, 1,3,4,5,6-pentakis-O-(TMS)-, O-methylxime | 569 | C ₂₂ H ₅₅ NO ₆ | 92 |
| 16 | 18.22 | 8.92 | 1869 | 1846 | D-Allose, pentakis(TMS) ether, methylxime (syn) | 569 | C ₂₂ H ₅₅ NO ₆ | 91 |
| 17 | 18.44 | 4.48 | 1879 | 1765 | Ribitol, 5TMS derivative | - | - | - |
| 18 | 18.56 | 1.60 | 1884 | - | Ethyl .alpha.-D-glucopyranoside, 4TMS derivative | 495 | C ₂₀ H ₄₈ O ₆ SI | 96 |
| 19 | 18.69 | 20.89 | 1891 | 1846 | D-Glucitol, 6TMS derivative | 614 | C ₂₄ H ₆₂ O ₆ SI | 95 |
| 20 | 18.98 | 0.66 | 2005 | - | .alpha.-D-Glactopyranose, 5TMS derivative | 540 | C ₂₁ H ₅₂ O ₆ SI | 96 |
| 21 | 19.15 | 0.60 | 2013 | 2904 | Epigallocatechin (6TMS) | 738 | C ₃₃ H ₆₂ O ₇ SI | 81 |
| 22 | 19.251 | 0.56 | 2018 | 2094 | Epigallocatechin (6TMS) | 738 | C ₃₃ H ₆₂ O ₇ SI | 76 |
| 23 | 19.38 | 1.36 | 2025 | 2042 | Palmitic Acid, TMS derivative | 328 | C ₁₉ H ₄₀ O ₂ SI | 95 |
| 24 | 20.21 | 0.57 | 2068 | 2076 | Myo-Inositol, 6TMS derivative | 612 | C ₂₄ H ₆₀ O ₆ SI | 92 |
| 25 | 20.45 | 0.66 | 2080 | - | 1-Octadecanol, TMS derivative | 342 | C ₂₁ H ₄₆ OSI | 97 |
| 26 | 21.05 | 0.96 | 2211 | 2175 | 9-Octadecenoic acid, (E)-, TMS derivative | 354 | C ₂₁ H ₄₂ O ₂ SI | 96 |
| 27 | 24.15 | 1.05 | 2592 | 2568 | 3-.alpha.-Mannobiose, octakis(TMS) ether (isomer 2) | 918 | C ₃₆ H ₈₆ O ₁₁ | 83 |
| 28 | 24.94 | 0.42 | 2643 | 2025 | Galacturonic acid, 2,3,4,5-tetrakis-O-(TMS)-, TMSester | 554 | C ₂₁ H ₅₀ O ₇ SI | 90 |
| 29 | 25.11 | 1.97 | 2654 | 2622 | Sucrose, 8TMS derivative | 918 | C ₃₆ H ₈₆ O ₁₁ | 97 |
| 30 | 25.36 | 3.05 | 2671 | 2622 | Sucrose, 8TMS derivative | 918 | C ₃₆ H ₈₆ O ₁₁ | 85 |
| 31 | 25.52 | 0.36 | 2681 | 2628 | 6-Hydroxyflavone-.beta.-D-glucoside, tetra(TMS)- | 688 | C ₃₃ H ₅₂ O ₈ SI | 88 |
| 32 | 26.27 | 1.76 | 2832 | 2816 | D-Trehalose, 7TMS derivative | 846 | C ₃₃ H ₇₈ O ₁₁ | 84 |
| 33 | 26.64 | 7.53 | 2858 | 2843 | D-Lactitol, nonakis(TMS) ether | 992 | C ₃₉ H ₉₆ O ₁₁ | 90 |
| 34 | 26.84 | 0.66 | 2872 | 1297 | Thymol-.beta.-d-glucopyranoside, tetrakis(O-TMS)- | 600 | C ₂₈ H ₅₆ O ₆ SI | 79 |
| 35 | 27.52 | 2.68 | 3017 | 1297 | Thymol-.beta.-d-glucopyranoside, tetrakis(O-TMS)- | 600 | C ₂₈ H ₅₆ O ₆ SI | 79 |

TMS: trimethylsilyl, **TR:** le temps de rétention (min), **AP:** l'air de pic, **IK_{cal}** les indices kovats sont déterminés sur une colonne DB-5 en utilisant la série homologue des *n*-alcanes, **IK_{lit}** les indices kovats de littérature, **PM:** poids moléculaire.

Tableau 17: Composition chimique de l'extrait Ethanol:acetone d'*E. nebrodensis* déterminée par CPG-MS.

| Pic | TR | AP % | IK cal | IK lit | Composés, TMS | PM | Formule chimique | % de Probabilité |
|-----|-------|------|--------|--------|--|-----|---|------------------|
| 1 | 6.59 | 0.46 | 1034 | 124 | Lactic Acid, 2TMS derivative | 234 | C ₉ H ₂₂ O ₃ Si ₂ | 95 |
| 2 | 10.08 | 0.64 | 1244 | 1274 | Glycerol, 3TMS derivative | 308 | C ₁₂ H ₃₂ O ₃ SI | 95 |
| 3 | 11.77 | 0.22 | 1401 | 1360 | R,R(-)-Pseudoephedrine, TMS ether | 237 | C ₁₃ H ₂₃ NOSI | 97 |
| 4 | 13.07 | 0.36 | 1450 | 1865 | Phenylpropanolamine, 2TMS derivative | 295 | C ₁₅ H ₂₉ NOSI | 98 |
| 5 | 13.11 | 0.37 | 1452 | 1487 | Malic acid, 3TMS derivative | 350 | C ₁₃ H ₃₀ O ₅ SI | 95 |
| 6 | 14.03 | 1.08 | 1486 | 1925 | Ephedrine, 2TMS derivative | 309 | C ₁₆ H ₃₁ NOSI | 98 |
| 7 | 15.92 | 0.74 | 1665 | 1699 | Levoglucozan, 3TMS derivative | 378 | C ₁₅ H ₃₄ O ₅ SI | 97 |
| 8 | 16.03 | 0.49 | 1669 | 1742 | Xylitol, 5TMS derivative | 512 | C ₂₀ H ₅₂ O ₅ SI | 95 |
| 9 | 16.64 | 3.55 | 1695 | 1666 | Arabinofuranose, 1,2,3,5-tetrakis-O-(TMS)- | 438 | C ₁₇ H ₄₂ O ₅ SI | 88 |
| 10 | 17.02 | 1.46 | 1813 | 1822 | Shikimic acid (4TMS) | 462 | C ₁₉ H ₄₂ O ₅ SI | 94 |
| 11 | 17.14 | 0.36 | 1818 | 1813 | Protocatechoic acid, 3TMS derivative | 370 | C ₁₆ H ₃₀ O ₄ SI | 85 |
| 12 | 17.42 | 1.20 | 1831 | - | 3-Deoxyhexitol, 5TMS derivative | 526 | C ₂₁ H ₅₄ O ₅ SI | 79 |
| 13 | 17.50 | 0.51 | 1835 | 1869 | D-Pinitol, pentakis(TMS) ether | 545 | C ₂₂ H ₅₄ O ₆ SI | 82 |
| 14 | 17.80 | 0.85 | 1849 | 2906 | Catechine, (2R-cis)-, 5TMS derivative | 650 | C ₃₀ H ₅₄ O ₆ SI | 81 |
| 15 | 17.92 | 3.61 | 1855 | 1847 | D-Fructose, 1,3,4,5,6-pentakis-O-(TMS)-, O-methyloxime | 569 | C ₂₂ H ₅₅ NO ₆ | 93 |
| 16 | 18.03 | 2.99 | 1860 | 1847 | D-Fructose, 1,3,4,5,6-pentakis-O-(TMS)-, O-methyloxime | 569 | C ₂₂ H ₅₅ NO ₆ | 92 |
| 17 | 18.21 | 3.67 | 1868 | 1846 | D-Allose, pentakis(TMS) ether, methyloxime (syn) | 569 | C ₂₂ H ₅₅ NO ₆ | 94 |
| 18 | 18.44 | 3.32 | 1879 | 1969 | D-Sorbitol, 6TMS derivative | 614 | C ₂₄ H ₆₂ O ₆ SI | 82 |
| 19 | 18.67 | 21.5 | 1889 | 1864 | D-Glucitol, 6TMS derivative | 614 | C ₂₄ H ₆₂ O ₆ SI | 95 |
| 20 | 19.15 | 1.45 | 2013 | 2904 | Epigallocatechin (6TMS) | 738 | C ₃₃ H ₆₂ O ₇ SI | 81 |
| 21 | 19.25 | 1.18 | 2018 | 2904 | Epigallocatechin (6TMS) | 738 | C ₃₃ H ₆₂ O ₇ SI | 80 |
| 22 | 19.38 | 2.30 | 2025 | 2042 | Palmitic Acid, TMS derivative | 328 | C ₁₉ H ₄₀ O ₂ SI | 95 |
| 23 | 20.45 | 0.35 | 2080 | | 1-Octadecanol, TMS derivative | 342 | C ₂₁ H ₄₆ OSI | 97 |
| 24 | 21.05 | 1.96 | 2212 | 2175 | 9-Octadecenoic acid, (E)-, TMS derivative | 354 | C ₂₁ H ₄₂ O ₂ SI | 96 |
| 25 | 21.27 | 0.56 | 2224 | 2239 | Stearic acid, TMS derivative | 356 | C ₂₁ H ₄₄ O ₂ SI | 96 |
| 26 | 23.00 | 0.71 | 2423 | 2451 | Eicosanoic acid, TMS | 384 | C ₂₁ H ₄₈ O ₂ SI | 93 |
| 27 | 24.15 | 2.59 | 2492 | 2568 | 3-.alpha.-Mannobiose, octakis(TMS) ether (isomer 2) | 918 | C ₃₆ H ₈₆ O ₁₁ | 83 |
| 28 | 24.61 | 1.04 | 2622 | 2644 | Behenic acid, TMS derivative | 412 | C ₂₅ H ₅₂ O ₂ SI | 94 |
| 29 | 25.11 | 5.34 | 2654 | 2622 | Sucrose, 8TMS derivative | 918 | C ₃₆ H ₈₆ O ₁₁ | 97 |
| 30 | 25.36 | 2.47 | 2671 | 2622 | Sucrose, 8TMS derivative | 918 | C ₃₆ H ₈₆ O ₁₁ | 84 |
| 31 | 25.52 | 0.32 | 2681 | 2628 | 6-Hydroxyflavone-.beta.-D-glucoside, tetra(TMS)- | 688 | C ₃₃ H ₅₂ O ₈ SI | 93 |
| 32 | 26.11 | 0.82 | 2821 | 2838 | Lignoceric acid, TMS derivative | 440 | C ₂₇ H ₅₆ O ₂ SI | 87 |
| 33 | 26.27 | 1.51 | 2832 | 2816 | D-Trehalose, 7TMS derivative | 846 | C ₃₃ H ₇₈ O ₁₁ | 84 |
| 34 | 26.84 | 0.89 | 2872 | 2816 | D-Trehalose, 7TMS derivative | 846 | C ₃₃ H ₇₈ O ₁₁ | 78 |
| 35 | 27.52 | 2.09 | 3017 | 1297 | Thymol-.beta.-d-glucopyranoside, tetrakis(O-TMS)- | 600 | C ₂₈ H ₅₆ O ₆ SI | 76 |
| 36 | 27.75 | 1.59 | 3033 | - | 1-Undecanol, TMS derivative | 244 | C ₁₄ H ₃₂ OSI | 90 |

TMS: trimethylsilyl, **TR:** le temps de rétention (min), **AP:** l'air de pic, **IK_{CAL}** les indices kovats sont déterminés sur une colonne DB-5 en utilisant la série homologue des *n*-alcane, **IK_{LIT}** les indices kovats de littérature, **PM:** poids moléculaire.

Tableau 18: Composition chimique de l'extrait acétate d'éthyle d'*E. nebrodensis* déterminée par CPG-MS.

| Pic | TR | AP % | IK cal | IK lit | Composés, TMS | PM | Formule chimique | % de Probabilité |
|-----|-------|-------|--------|--------|---|-----|---|------------------|
| 1 | 10.07 | 0.5 | 1244 | 1274 | Glycerol, 3TMS derivative | 308 | C ₁₂ H ₃₂ O ₃ SI | 93 |
| 2 | 11.77 | 1.64 | 1401 | 1360 | R,R(-)-Pseudoephedrine, TMS ether | 237 | C ₁₃ H ₂₃ NOSI | 99 |
| 3 | 13.11 | 0.9 | 1451 | 1487 | Malic acid, 3TMS derivative | 350 | C ₁₃ H ₃₀ O ₅ SI | 95 |
| 4 | 15.89 | 0.5 | 1664 | 1699 | Levoglucosan, 3TMS derivative | 378 | C ₁₅ H ₃₄ O ₅ SI | 85 |
| 5 | 16.03 | 0.5 | 1669 | 1742 | Xylitol, 5TMS derivative | 512 | C ₂₀ H ₅₂ O ₅ SI | 95 |
| 6 | 16.64 | 2.3 | 1695 | 1666 | Arabinofuranose, 1,2,3,5-tetrakis-O-(TMS)- | 438 | C ₁₇ H ₄₂ O ₅ SI | 87 |
| 7 | 16.77 | 0.31 | 1801 | 1801 | D-(-)-Tagatofuranose, pentakis(TMS) ether (isomer 2) | 540 | C ₂₁ H ₅₂ O ₆ SI | 78 |
| 8 | 17.02 | 1.67 | 1812 | 1822 | Shikimic acid (4TMS) | 462 | C ₁₉ H ₄₂ O ₅ SI | 95 |
| 9 | 17.80 | 0.51 | 1849 | 2906 | Catechine, (2R-cis)-, 5TMS derivative | 650 | C ₃₀ H ₅₄ O ₆ SI | 81 |
| 10 | 17.92 | 2.72 | 1855 | 1847 | D-Fructose, 1,3,4,5,6-pentakis-O-(TMS)-, O-methyloxime | 569 | C ₂₂ H ₅₅ NO ₆ | 93 |
| 11 | 18.03 | 2.7 | 1860 | 1847 | D-Fructose, 1,3,4,5,6-pentakis-O-(TMS)-, O-methyloxime | 569 | C ₂₂ H ₅₅ NO ₆ | 92 |
| 12 | 18.21 | 4.41 | 1868 | 1846 | D-Allose, pentakis(TMS) ether, methyloxime (syn) | 569 | C ₂₂ H ₅₅ NO ₆ | 93 |
| 13 | 18.43 | 2.17 | 1878 | 1878 | D-(+)-Talose, pentakis(TMS) ether, methyloxime (syn) | 569 | C ₂₂ H ₅₅ NO ₆ | 89 |
| 14 | 18.67 | 27.69 | 1890 | 1864 | D-Glucitol, 6TMS derivative | 614 | C ₂₄ H ₆₂ O ₆ SI | 95 |
| 15 | 18.98 | 0.51 | 2005 | 1989 | .alpha.-D-Glactopyranose, 5TMS derivative | 540 | C ₂₁ H ₅₂ O ₆ SI | 96 |
| 16 | 19.15 | 1.02 | 2013 | 2904 | Epigallocatechin (6TMS) | 738 | C ₃₃ H ₆₂ O ₇ SI | 81 |
| 17 | 19.24 | 0.79 | 2018 | 2904 | Epigallocatechin (6TMS) | 738 | C ₃₃ H ₆₂ O ₇ SI | 81 |
| 18 | 19.38 | 1.51 | 2025 | 2042 | Palmitic Acid, TMS derivative | 328 | C ₁₉ H ₄₀ O ₂ SI | 95 |
| 19 | 20.21 | 0.32 | 2068 | 2076 | Myo-Inositol, 6TMS derivative | 612 | C ₂₄ H ₆₀ O ₆ SI | 92 |
| 20 | 20.45 | 0.4 | 2080 | - | 1-Octadecanol, TMS derivative | 342 | C ₂₁ H ₄₆ O ₂ SI | 97 |
| 21 | 21.05 | 1.08 | 2211 | 2175 | 9-Octadecenoic acid, (E)-, TMS derivative | 354 | C ₂₁ H ₄₂ O ₂ SI | 95 |
| 22 | 21.26 | 0.3 | 2224 | 2239 | Stearic acid, TMS derivative | 356 | C ₂₁ H ₄₄ O ₂ SI | 96 |
| 23 | 24.16 | 1.63 | 2492 | 2568 | 3-.alpha.-Mannobiose, octakis(TMS) ether (isomer 2) | 918 | C ₃₆ H ₈₆ O ₁₁ | 83 |
| 24 | 24.61 | 0.35 | 2622 | 2644 | Behenic acid, TMS derivative | 412 | C ₂₅ H ₅₂ O ₂ SI | 93 |
| 25 | 24.94 | 0.72 | 2643 | 2025 | Galacturonic acid, 2,3,4,5-tetrakis-O-(TMS)-, TMS ester | 554 | C ₂₁ H ₅₀ O ₇ SI | 76 |
| 26 | 25.11 | 10.33 | 2654 | 2622 | Sucrose, 8TMS derivative | 918 | C ₃₆ H ₈₆ O ₁₁ | 97 |
| 27 | 25.36 | 3.36 | 2671 | 2622 | Sucrose, 8TMS derivative | 918 | C ₃₆ H ₈₆ O ₁₁ | 85 |
| 28 | 26.11 | 0.42 | 2821 | 2838 | Lignoceric acid, TMS derivative | 440 | C ₂₇ H ₅₆ O ₂ SI | 77 |
| 29 | 26.27 | 2.27 | 2832 | 1297 | Thymol-.beta.-d-glucoopyranoside, tetrakis(O-TMS)- | 600 | C ₂₈ H ₅₆ O ₆ SI | 84 |
| 30 | 26.99 | 0.67 | 2882 | 2843 | D-Lactitol, nonakis(TMS) ether | 992 | C ₃₉ H ₉₆ O ₁₁ | 89 |
| 31 | 27.52 | 2.95 | 3017 | 1297 | Thymol-.beta.-d-glucoopyranoside, tetrakis(O-TMS)- | 600 | C ₂₈ H ₅₆ O ₆ SI | 76 |

TMS: trimethylsilyl, **TR:** le temps de rétention (min), **AP:** l'air de pic, **IK_{CAL}** les indices kovats sont déterminés sur une colonne DB-5 en utilisant la série homologue des *n*-alcanes, **IK_{lit}** les indices kovats de littérature **PM:** poids moléculaire.

Résultats et discussion

Tableau 19: Composition chimique de la l'extrait (AQ) d'*E. nebrodensis* déterminée par CPG-MS.

| Pic | TR | AP % | IK cal | IK lit | Composés, TMS | PM | Formule chimique | % de Probabilité |
|-----|--------|-------|-----------|-----------|---|-----|---|---------------------|
| 1 | 6.582 | 0.39 | 1033 | 1024 | Lactic Acid, 2TMS derivative | 234 | C ₉ H ₂₂ O ₃ SI ₂ | 97 |
| 2 | 6.81 | 0.45 | 1040 | - | Glycolic acid, 2TMS derivative | - | - | - |
| 3 | 10.07 | 1.44 | 1244 | 1274 | Glycerol, 3TMS derivative | 308 | C ₁₂ H ₃₂ O ₃ SI | 86 |
| 4 | 10.39 | 0.87 | 1255 | - | L-Proline, 2TMS derivative | 259 | C ₁₁ H ₂₅ NO ₂ | 96 |
| 5 | 11.77 | 0.70 | 1401 | 1360 | R,R(-)-Pseudoephedrine, TMS ether | 237 | C ₁₃ H ₂₃ NOSI | 98 |
| 6 | 13.54 | 0.61 | 1468 | 1515 | L-5-Oxoproline, 2TMS derivative | 273 | C ₁₁ H ₂₃ NO ₃ | 96 |
| 7 | 14.03 | 1.93 | 1486 | 1925 | Ephedrine, 2TMS derivative | 309 | C ₁₆ H ₃₁ NOSI | 98 |
| 8 | 16.02 | 1.09 | 1669 | 1742 | Xylitol, 5TMS derivative | 512 | C ₂₀ H ₅₂ O ₅ SI | 95 |
| 9 | 16.64 | 0.64 | 1795 | 1666 | Arabinofuranose, 1,2,3,5-tetrakis-O-(TMS)- | 438 | C ₁₇ H ₄₂ O ₅ SI | 87 |
| 10 | 17.02 | 3.28 | 1812 | 1822 | Shikimic acid (4TMS) | 462 | C ₁₉ H ₄₂ O ₅ SI | 95 |
| 11 | 17.218 | 2.14 | 1821 | - | Pentaric acid, 2,3-dideoxy-4-O-(trimethylsilyl)-3-[[[(TMS)oxy]carbonyl]-, bis(TMS) ester | 480 | C ₁₈ H ₄₀ OSI | 82 |
| 12 | 17.35 | 0.49 | 1828 | 1847 | D-Fructose, 5TMS derivative | 540 | C ₂₁ H ₅₂ O ₆ SI | 94 |
| 13 | 17.83 | 1.37 | 1850 | 1861 | .beta.-D-(-)-Tagatopyranose, 5TMS derivative | 540 | C ₂₁ H ₅₂ O ₆ SI | 93 |
| 14 | 17.92 | 6.23 | 1855 | 1847 | D-Fructose, 1,3,4,5,6-pentakis-O-(TMS)-, O-methyloxime | 569 | C ₂₂ H ₅₅ NO ₆ | 93 |
| 15 | 17.99 | 1.61 | 1858 | 1742 | Xylitol, 5TMS derivative | 512 | C ₂₀ H ₅₂ O ₅ SI | 90 |
| 16 | 18.02 | 4.69 | 1859 | 1847 | D-Fructose, 1,3,4,5,6-pentakis-O-(TMS)-, O-methyloxime | 569 | C ₂₂ H ₅₅ NO ₆ | 92 |
| 17 | 18.21 | 1.13 | 1868 | 1846 | D-Allose, pentakis(TMS) ether, methyloxime (syn) | 569 | C ₂₂ H ₅₅ NO ₆ | 94 |
| 18 | 18.69 | 31.50 | 1890 | 1864 | D-Glucitol, 6TMS derivative | 614 | C ₂₄ H ₆₂ O ₆ SI | 95 |
| 19 | 19.37 | 0.94 | 2025 | 2042 | Palmitic Acid, TMS derivative | 328 | C ₁₉ H ₄₀ O ₂ SI | 95 |
| 20 | 20.21 | 0.80 | 2068 | 2076 | Myo-Inositol, 6TMS derivative | 612 | C ₂₄ H ₆₀ O ₆ SI | 93 |
| 21 | 21.04 | 0.63 | 2211 | 2175 | 9-Octadecenoic acid, (E)-, TMS derivative | 354 | C ₂₁ H ₄₂ O ₂ SI | 96 |
| 22 | 23.00 | 0.33 | 2422 | 2451 | Eicosanoic acid, TMS | 384 | C ₂₁ H ₄₈ O ₂ SI | 93 |
| 23 | 24.15 | 0.45 | 2492 | 2568 | 3-.alpha.-Mannobiose, octakis(TMS) ether (isomer 1) | 718 | C ₃₆ H ₈₆ O ₁₁ | 83 |
| 24 | 24.45 | 0.33 | 2611 | 2597 | .alpha.-D-Lactose, 8TMS derivative | 918 | C ₃₆ H ₈₆ O ₁₁ | 89 |
| 25 | 24.61 | 0.52 | 2621 | 2644 | Behenic acid, TMS derivative | 412 | C ₂₅ H ₅₂ O ₂ SI | 95 |
| 26 | 25.10 | 1.05 | 2654 | 2622 | Sucrose, 8TMS derivative | 918 | C ₃₆ H ₈₆ O ₁₁ | 90 |
| 27 | 25.36 | 2.76 | 2670 | 2622 | Sucrose, 8TMS derivative | 918 | C ₃₆ H ₈₆ O ₁₁ | 85 |
| 28 | 26.27 | 1.52 | 2832 | 2364 | D-Fructose, 3-O-[2,3,4,6-tetrakis-O-(TMS)-.alpha.-D-glucopyranosyl]-1,4,5,6-tetrakis-O-(TMS)- | 918 | C ₃₆ H ₈₆ O ₁₁ | 85 |
| 29 | 26.63 | 8.75 | 2857 | 2843 | D-Lactitol, nonakis(TMS) ether | 992 | C ₃₉ H ₉₆ O ₁₁ | 92 |
| 30 | 26.9 | 0.43 | 2876 | 2843 | D-Lactitol, nonakis(TMS) ether | 992 | C ₃₉ H ₉₆ O ₁₁ | 85 |
| 31 | 27.51 | 2.36 | 3017 | 1297 | Thymol-.beta.-d-glucopyranoside, tetrakis(O-TMS)- | 600 | C ₂₈ H ₅₆ O ₆ SI | 75 |

TMS: trimethylsilyl, **TR:** le temps de rétention (min), **AP:** l'air de pic, **IK_{CAL}** les indices kovats sont déterminés sur une colonne DB-5 en utilisant la série homologue des *n*-alcanes, **IK_{LIT}** les indices kovats de littérature, **PM:** poids moléculaire.

La CPG-MS des extraits MeOH, EtOH, EtAce, EtOAc et AQ de la plante a révélé la présence d'autres composés, tels que les alcaloïdes, la pseudoéphédrine (TR : 11,8), éphédrine (TR : 14,03) dans les extraits EtOH, EtAce et AQ et Phenylpropanolamine (noréphédrine) (TR : 13,07) dans l'extrait EtAce (Tableau 17). Ces résultats sont confirmés par Lv et al. (2015), où ils ont identifié l'éphédrine, la pseudoéphédrine, la noréphédrine, la norpseudoéphédrine, la méthyléphédrine dans une étude métabolomique basée sur la CPG-MS des tiges et racines d'*E. sinica* de Chine, aussi l'alanine, le glycérol, la proline, l'acide malique, l'acide cinnamique, l'acide glutamique, l'acide *p*-hydroxybenzoïque, le mannose, le xylitol et le glucitol.

Ces résultats sont en parfaite concordance avec celle de Aghdasi et al. (2016) ; Ballero et al. (2010), Groves et al. (2015) et Krizevski et al. (2010) qui ont identifiés et isolés les alcaloïdes (D(-)- Ephedrine, L(+)- Pseudoephedrine, L(+)- Norepseudoephedrine, D(-) Methylephedrine et L(+)- Methylpseudoephedrine dans les espèces *E. nebrodensis* et *E. sinica*.

Les polyphénols identifiés dans la plante sont : l'acide protocatéchuique (TR : 17.14) et le 6-hydroxyflavone (TR : 25.52) dans les extraits (EtOH et EtAce). Puis les Flavan-3-ols : épigallocatechine isomère 1 et 2 (TR : 19.15/ 19.25) dans les extraits (MeOH, EtOH, EtAce et EtOAc), la catéchine (TR : 17.80) a été identifié dans les extraits EtAce et EtOAc. Ces résultats sont en concordance avec celle d'Amakura et al. (2013) et Cottiglia et ses collaborateurs. (2005) qui ont identifiés (-)-Epicatechinedans *E. nebrodensis* et *E. sinica* et la Catéchine dans *E. sinica* (Amakura et al., 2013),

L'analyse CPG-MS des extraits d'*E. nebrodensis* est la première fois effectuée dans cette étude, donc il est difficile de trouver des études pour discuter nos résultats.

Maggi et al. (2010) ils ont travaillé sur L'huile essentielle d'*E. nebrodensis* qui pousse dans le centre de l'Italie, cette huile a été analysée par CPG et CPG-MS, Cinquante-neuf composants ont été identifiés, représentant 89,3 % de l'huile étudiée. Les monoterpènes oxygénés représentent 33,0 %, et le citronellol (29,7 %), les esters constituent le deuxième groupe le plus abondant (18,8 %), l'hexadécanoate d'éthyle (9,5 %) étant le principal représentant dans la fraction étudiée.

D'autre recherche par Kobaisy et al. (2005) ont étudié la composition chimique des huiles essentielles des parties aériennes de *E. distachya*, *E. fragilis*, et *E. major* d'Italie par CPG et

CPG/MS. Les principaux constituants trouvés dans l'huile d'*E. distachya* étaient le benzoate d'éthyle (46,9 %), le benzaldéhyde (8,0 %) et le cis-calamène (3,6 %). Dans l'huile d'*E. fragilis*, les principaux composants étaient le (*E*)-phytol (10,1 %), le pentacosane (5,2 %), le 6,10,14-triméthyl-2-pentadécanone (5,3 %), le *cis*-thujopsène (3,5 %) et le α -terpinéol (3,0 %). L'huile d'*E. major* contenait de l'eugénol (4,3 %), du α -terpinéol (3,7 %) et du linoléate de méthyle (3,5 %) comme principaux composants.

IV. Etude toxicologique *in vivo*

Historiquement dans la médecine traditionnelle, *E. nebrodensis* est utilisé dans le traitement de l'asthme, la bronchite et différentes allergies. Vue sa richesse en composés phénoliques notamment les flavonoïdes. Toute fois jusqu'à ce jours aucun rapport n'a été publier sur l'évaluation de sa toxicité, c'est pour cela des études toxicologiques sont nécessaire pour déterminer l'innocuité, pour évaluer le profil toxicologiques dont le but de choisir une dose sûr.

IV.1. Toxicité aiguë

La toxicité orale aiguë des extraits a été étudiée, la souris a été l'une des mammifères utilisés dans les études précliniques de la pharmacologie et de l'évaluation de la sécurité des produits. L'utilisation de souris comme modèles dans l'évaluation de la sécurité sont actuellement exigées dans les directives internationales pour à la fois des produits chimiques et des produits pharmaceutiques. Ainsi, la souris est un modèle animal idéal pour diverses expériences en raison de sa petite taille, faible durée de vie, disponibilité facile et faible coût (Hedrich et Bullock, 2004).

IV.1.1. Observations

Le test de toxicité aiguë a montré que les extraits EtOH, MeOH, EtAce, EtOAc et AQ à différentes doses testées (2000 et 5000 mg/kg), ils ne présentaient pas des symptômes toxiques, ni mortalité et aucun changement de comportement évident n'a été observée chez toutes les souris. Par conséquent, ces résultats indiquent qu'avec une dose unique, il n'y a pas d'effets indésirables, ce qui signifie que la dose létale moyenne (DL₅₀) est supérieure à 5000 mg/kg pour les souris mâles et femelles. Les extraits de la plante peuvent être considéré non toxiques selon la méthode de classification de la toxicité aiguë (Duan et Liang, 2011).

IV.1.2. Changements de poids corporel

Les résultats de la toxicité aiguë ont montré que le poids corporel chez les souris mâles n'est pas affecté après un traitement par les extraits MeOH et AQ à différentes doses. Par contre le traitement par les extraits EtOH, EtAce et EtOAc a provoqué une diminution de poids corporel (Figure 17).

L'administration orale des extraits d'*E. nebrodensis* chez les souris femelles à différentes doses provoque une diminution de poids corporel des animaux traités par rapport au groupe non traité, à l'exception pour l'extrait EtOAc. Les résultats du changement de poids corporel des souris sont présentés dans la Figure 17.

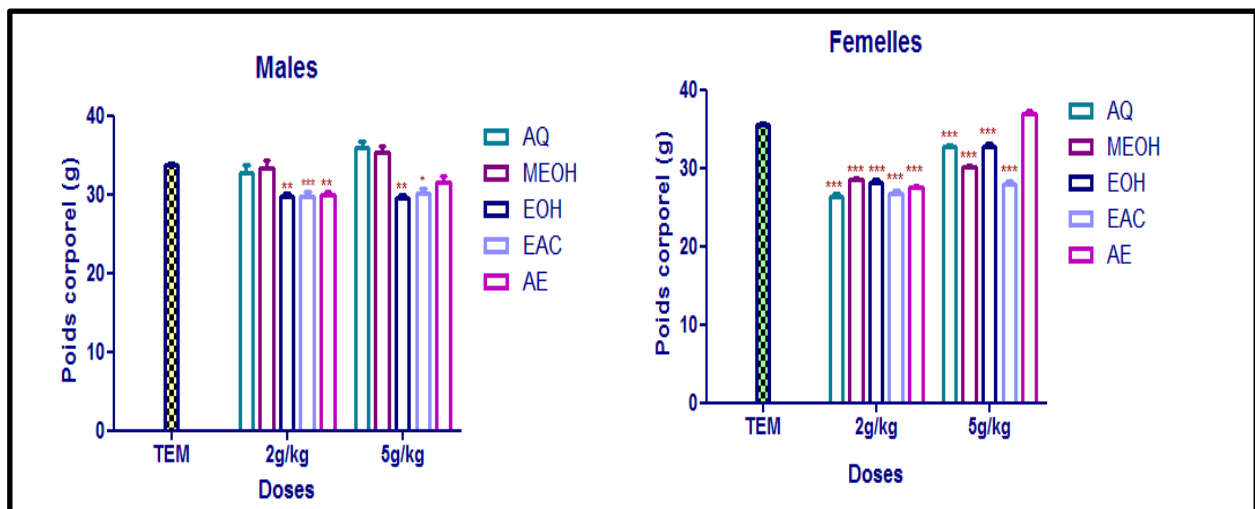


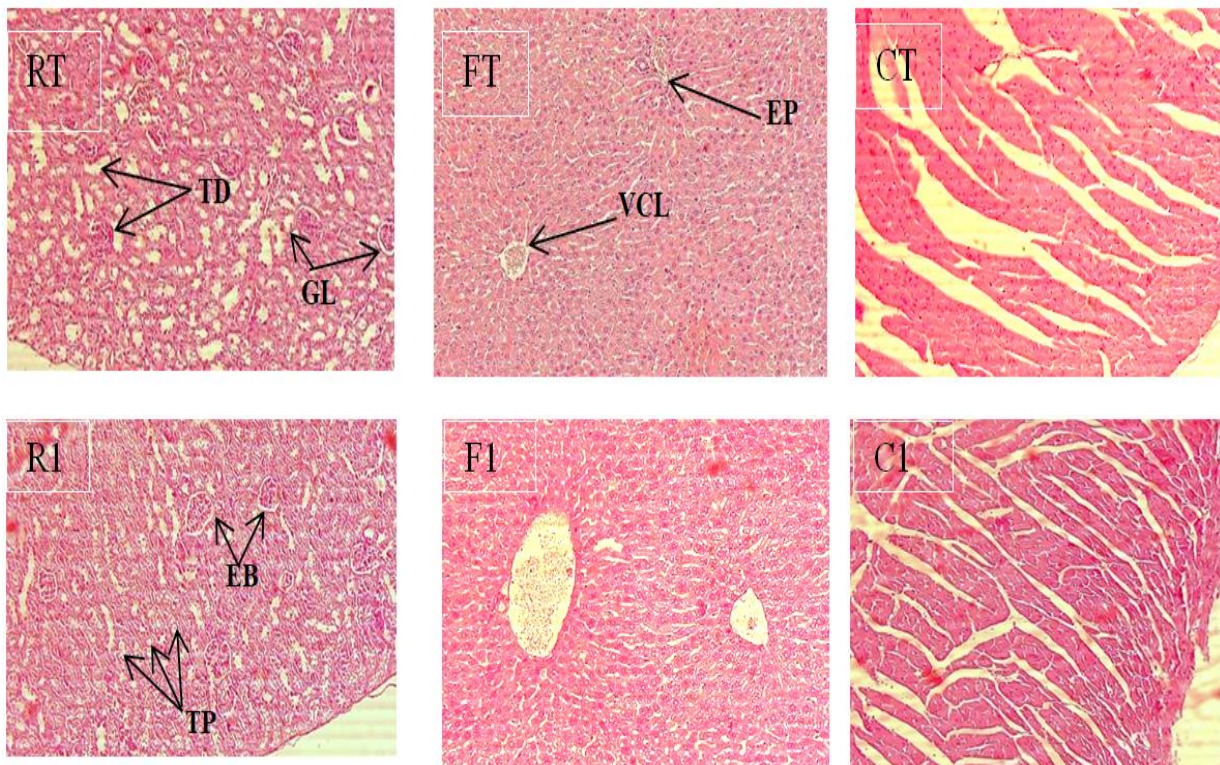
Figure 8: L'évolution du poids corporel des souris mâles et femelles traités par les extraits EtOAc : extrait acétate éthyle. EtAce : extrait Ethanol :acétone. EtOH : extrait ethanolique 70%. MeOH : extrait méthanolique 85%. AQ : extrait aqueux, en comparaison avec le groupe témoin (TEM) : non traités. Pendant une durée de 15 jours .Valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (n=4). (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001) comparés avec le groupe témoin.

la suppression de la prise de poids dans cette étude pourrait très bien être le résultat d'une diminution de l'appétit (diminution de la prise alimentaire et la consommation d'eau) et donc d'un apport calorique plus faible chez les animaux, comme cela a été démontré pour certaines plantes et leurs constituants, tels que l'éphédrine et d'autres composés actifs dans le genre des plantes Ephedra (Avula et al., 2006).

IV.1.3. Etude histologique

L'évaluation histopathologique des organes vitaux le foie, les reins et le cœur dans la figure 18 n'a montré aucun changement macroscopique et histologique pertinent dans le groupe témoin et les souris traitées avec les différents extraits (2000 mg/kg). Le foie présentait une architecture normale et aucun signe de lésion. le rein présentait des glomérules adéquats et des tubules normaux, ces observations sont en corrélation avec celle rapportés par (Rezzagui et *al.*, 2020 ; Aouachriaa el *al.*, 2017).

Cependant, les coupes histologiques du foie de souris traitées avec les extraits MeOH, EtAce, EtOH et EtOAc (5000 mg/kg) a montré une congestion vasculaire modérée et une nécrose lobulaire pour la dose la plus élevée dans l'extrait EtOAc (5000 mg/kg). Des lésions de néphrite interstielle subaiguë non spécifique ont également été observées sur des coupes de reins des souris traités par les extraits MeOH et EtOAc à la dose de 5000 mg/kg. Les coupes histologiques du foie, des reins et le coeur des souris traitées par rapport aux témoins sont présentées dans la figure 18. Pour les coupes histologiques du cœur, elles montrent une paroi cardiaque sans particularité, myocarde et péricarde de morphologie conservée.



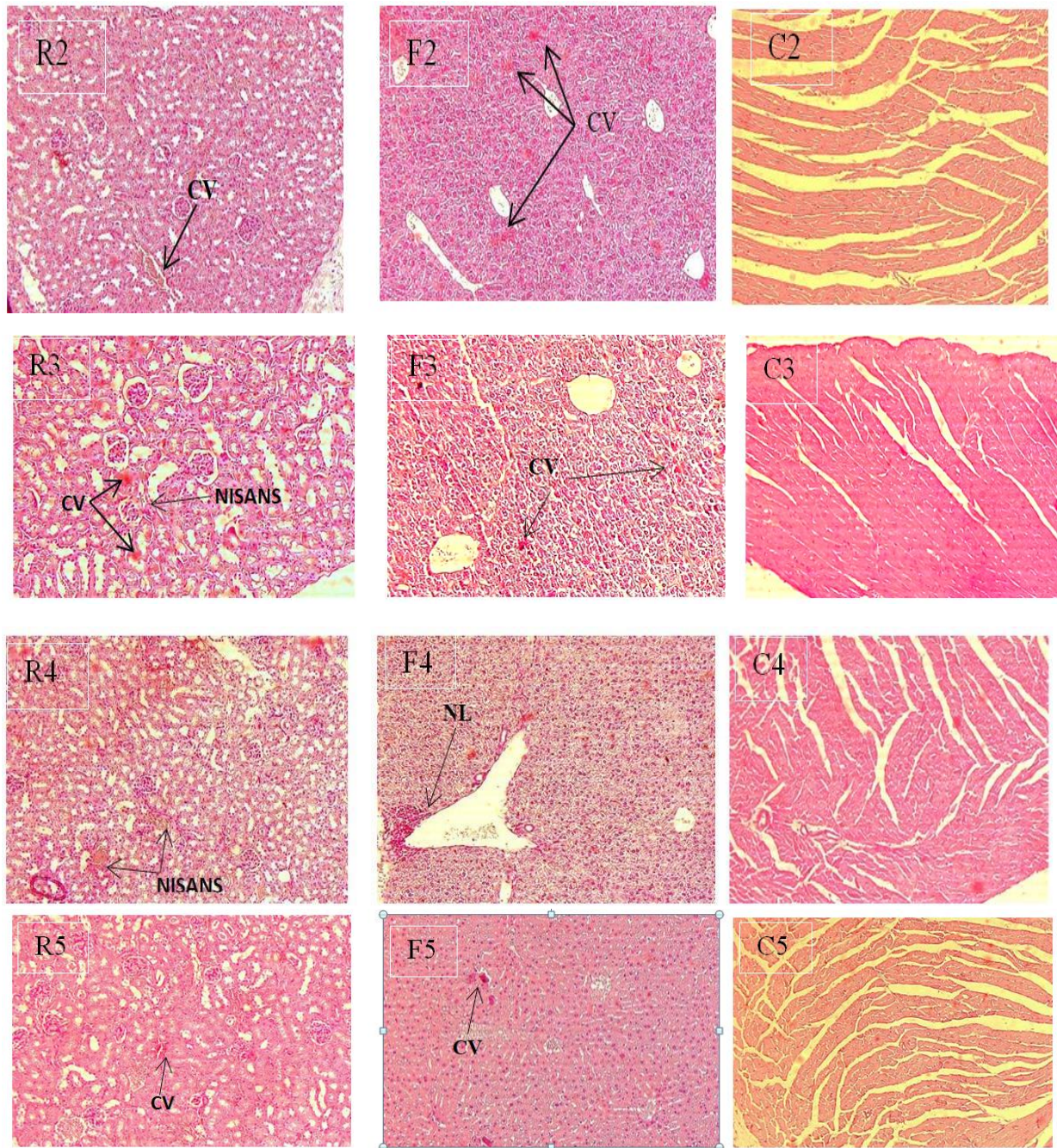


Figure 9: Coupes Histologiques de la toxicité aigüe de tissus des souris du groupe témoin ayant reçu de l'eau distillée par voie orale (FT: foie de groupe témoin, RT: rein de groupe témoin, CT: cœur de groupe témoin). Des souris ayant reçu de l'extrait AQ à la dose 5g/kg (F1: foie, R1: rein, C1: cœur). Des souris du groupe ayant reçu de l'extrait EtAce à la dose 5g/kg (F2: foie, R2: rein, C2: cœur). Des souris du groupe ayant reçu de l'extrait MeOH à la dose 5g/kg (F3: foie, R3: rein, C3: cœur). Des souris du groupe ayant reçu de l'extrait EtOAc à la dose 5g/kg (F4: foie, R4: rein, C4: cœur). Des souris du groupe ayant reçu de l'extrait EtOH à la dose 5g/kg (F5: foie, R5: rein, C5: cœur). CV: congestion vasculaire, NISANS : néphrite interstitielle subaigüe non spécifique, NL : nécros lobulaire. GL: glomérule, TP: tubes proximaux, TD : tubes distaux, EB espace de Bowmen. EP : espace porte. VCL : veine centro-lobulaire. Grossissement ($\times 100$). Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (HE).

IV.2. Toxicité Subaiguë

IV.2.1. Signes de toxicité

Aucune mortalité n'a été observée chez les animaux traités par l'extrait (AQ) tout au long de l'expérience. Les rats femelles et mâles qui ont reçu des doses de 300, 600 et 1200 mg/kg/jour pendant la période d'expérimentation, aucun changement de comportement n'a été constaté dans les groupes traités.

IV.2.2. Poids corporel, consommation alimentaire et consommation d'eau

On a noté une augmentation du poids corporel des groupes traités par rapport au groupe témoin (Tableau 20). On a observé une augmentation très significative ($p < 0,001$) du poids corporel des rats mâles traités avec l'extrait (AQ) à la dose 1200 mg/kg, contrairement au poids corporel des femelles qui a évolué d'une manière modérée.

Tableau 20: Poids corporels chez les rats femelles et mâles pendant 30 jours de traitement.

| Jours | témoins | 300 mg/kg | 600 mg/kg | 1200 mg/kg |
|-------------------|----------------|-----------------------------|--------------------------------|--------------------|
| Femelles | | | | |
| 1 ^{er} | 156,63 ± 3,14 | 176,88 ± 3,33* | 180,80 ± 3,30* | 188,70 ± 5,03*** |
| 7 ^{ème} | 167,95 ± 4,22 | 180,03 ± 4,46 ^{ns} | 188,87 ± 5,87* | 192,50 ± 6,15** |
| 14 ^{ème} | 178,73 ± 3,66 | 189,60 ± 6,00 ^{ns} | 192,33 ± 3,97 ^{ns} | 201,43 ± 4,72* |
| 21 ^{ème} | 181,70 ± 6,05 | 188,23 ± 8,93 ^{ns} | 199,93 ± 5,15 ^{ns} | 199,58 ± 5,08 |
| 28 ^{ème} | 185,58 ± 4,44 | 198,85 ± 7,99 ^{ns} | 199,80 ± 5,07 ^{ns} | 209,83 ± 6,73* |
| Mâles | | | | |
| 1 ^{er} | 158,03 ± 3,82 | 175,20 ± 5,32 ^{ns} | 183,325 ± 4,667 ^{ns} | 263,150 ± 6,734*** |
| 7 ^{ème} | 179,47 ± 8,41 | 195,08 ± 6,08 ^{ns} | 202,500 ± 9,406 ^{ns} | 280,350 ± 9,365*** |
| 14 ^{ème} | 217,47 ± 12,04 | 232,35 ± 3,49 ^{ns} | 240,400 ± 9,035 ^{ns} | 293,450 ± 9,800*** |
| 21 ^{ème} | 229,67 ± 15,97 | 253,75 ± 3,93 ^{ns} | 256,825 ± 11,165 ^{ns} | 308,225 ± 8,943*** |
| 28 ^{ème} | 241,97 ± 17,79 | 266,45 ± 4,07 ^{ns} | 271,950 ± 12,156 ^{ns} | 301,725 ± 5,966*** |

Valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM (n=4), (ns: non significatif, *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001) comparés avec le groupe témoin.

L'augmentation progressive du poids corporel chez les rats femelles et mâles (Tableau 20) pendant 30 jours d'administration de l'extrait (AQ) de la partie aérienne d'*E. nebrodensis* peut indiquer l'amélioration de l'état nutritionnel des animaux. L'effet sur la réponse de croissance pourrait être le résultat d'une augmentation de l'apport en nourriture et en eau.

La consommation alimentaire et la consommation d'eau a augmenté de manière significative tant chez les mâles que chez les femelles à des doses de 300, 600 et 1200 mg/kg par rapport au groupe contrôle ($p < 0,001$) comme il est illustré dans les Figures 19 et 20. Ces résultats sont en corrélation avec l'évolution du poids corporel.

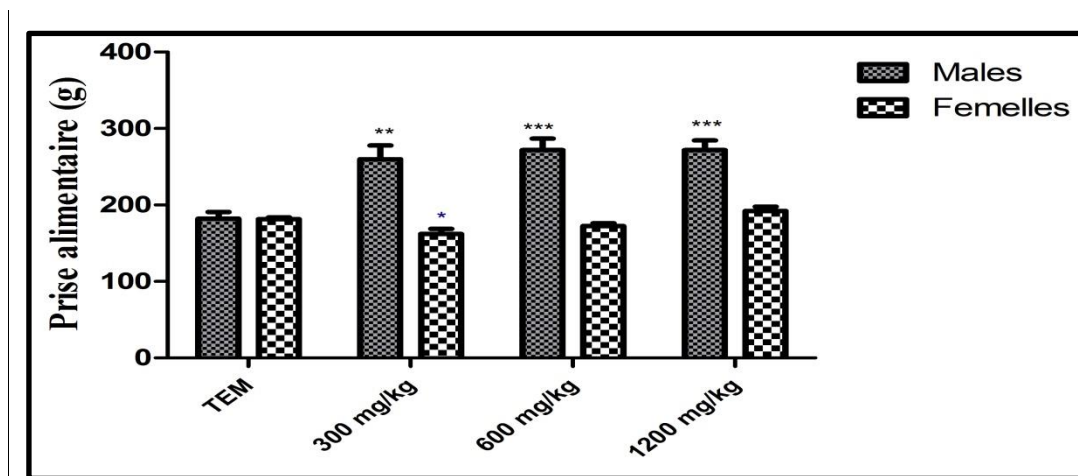


Figure 10: Prise alimentaire chez les rats mâles et femelles pendant 30 jrs de traitement. (ns: non significatif, * $P < 0.05$) comparés avec le groupe témoin.

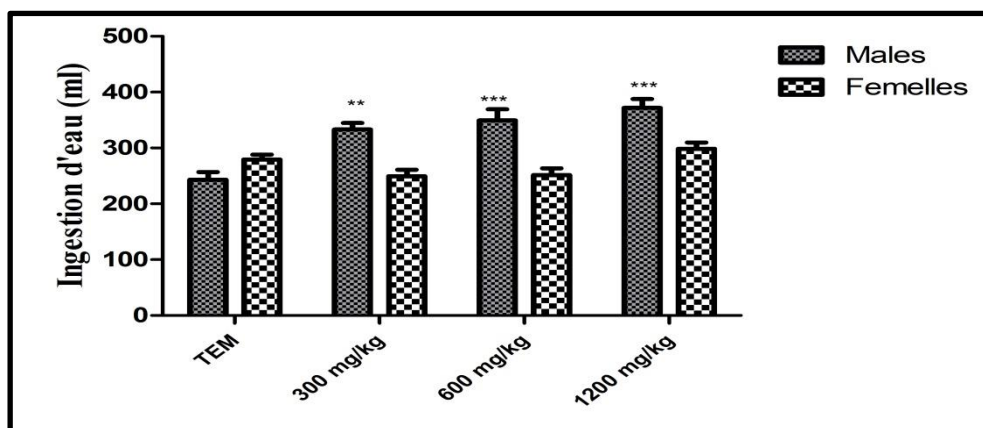


Figure 11: l'ingestion d'eau chez les rats mâles et femelles pendant 30 jrs de traitement. (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) comparés avec le groupe témoin.

IV.2.3. Poids des organes

Les résultats du poids relatif des organes sont présentés dans le tableau 21. Le poids relatif des organes (cœur, foie, reins, poumons, rate et cerveau) des groupes femelles à différentes doses

Résultats et discussion

(300, 600 et 1200mg/kg), ne présentait aucune différence significative ($p > 0,05$) par rapport au groupes contrôle. Cependant, le changement dans le poids relatif de la rate chez les rats mâles et les femelles a été significativement plus élevé à la dose 1200mg/kg que dans le groupe de contrôle ($p < 0,001$). Tandis que chez les rats mâles, le poids relatif (des reins, cœur et testicules) était statistiquement plus élevé à 1200 mg/kg par rapport au groupe témoin ($p < 0,01$).

Tableau 21: Poids relatifs des organes chez les rats femelles et mâles après un traitement de 30 jours par l'extrait (AQ).

| Organes | Témoins | 300 mg/kg | 600 mg/kg | 1200 mg/kg |
|-------------------|---------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Femelles | | | | |
| Foie | 4,074 ± 0,092 | 4,312 ± 0,079 ^{ns} | 4,218 ± 0,288 ^{ns} | 4,200 ± 0,236 ^{ns} |
| Reins | 0,694 ± 0,024 | 0,663 ± 0,036 ^{ns} | 0,652 ± 0,006 ^{ns} | 0,680 ± 0,014 ^{ns} |
| Poumons | 0,632 ± 0,011 | 0,715 ± 0,050 ^{ns} | 0,650 ± 0,069 | 0,631 ± 0,033 ^{ns} |
| Cœur | 0,309 ± 0,010 | 0,307 ± 0,006 ^{ns} | 0,318 ± 0,003 ^{ns} | 0,307 ± 0,005 ^{ns} |
| Rate | 0,303 ± 0,018 | 0,310 ± 0,050 ^{ns} | 0,336 ± 0,011 ^{ns} | 0,590 ± 0,026 ^{***} |
| Cerveau | 0,796 ± 0,055 | 0,838 ± 0,064 ^{ns} | 0,935 ± 0,033 ^{ns} | 0,761 ± 0,084 ^{ns} |
| Mâles | | | | |
| Foie | 3,545 ± 0,145 | 3,579 ± 0,050 ^{ns} | 3,473 ± 0,071 ^{ns} | 3,616 ± 0,144 ^{ns} |
| Reins | 0,649 ± 0,008 | 0,623 ± 0,010 ^{ns} | 0,692 ± 0,018 ^{ns} | 0,679 ± 0,023 ^{**} |
| Poumons | 0,562 ± 0,010 | 0,676±0,030 ^{ns} | 0,607 ± 0,063 ^{ns} | 0,511 ± 0,029 ^{ns} |
| Cœur | 0,302 ± 0,006 | 0,308 ± 0,008 ^{ns} | 0,316 ± 0,019 ^{ns} | 0,325 ± 0,004 ^{**} |
| Rate | 0,283 ± 0,021 | 0,316 ± 0,021 ^{ns} | 0,288 ± 0,022 ^{ns} | 0,448 ± 0,029 ^{***} |
| Cerveau | 0,681 ± 0,037 | 0,692 ± 0,031 ^{ns} | 0,640 ± 0,051 ^{ns} | 0,592 ± 0,037 ^{ns} |
| Testicules | 0,991 ± 0,081 | 1,000 ± 0,101 ^{ns} | 1,054 ± 0,037 ^{ns} | 1,093 ± 0,022 ^{**} |
| Epididyme | 0,473 ± 0,030 | 0,370 ± 0,026 ^{ns} | 0,384 ± 0,013 ^{ns} | 0,322 ± 0,016 ^{ns} |

Effet de l'extrait (AQ) sur le poids relatifs des organes des rats mâles et femelles. Valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM (n=4), (ns: non significatif, **P<0,01, ***P<0,001) comparés avec le groupe témoin.

Résultats et discussion

IV.2.4. Paramètres hématologiques

Tableau 22: Paramètres hématologiques chez rats mâles après un traitement de 30 jours.

| Paramètres | Contrôle | 300 mg/kg | 600 mg/kg | 1200 mg/kg |
|--|------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| Femelles | | | | |
| GB (10³/mm³) | 6,633 ± 0,595 | 5,525 ± 0,221 ^{ns} | 6,500 ± 0,550 ^{ns} | 6,066 ± 0,538 ^{ns} |
| GR (10⁶/mm³) | 6,990±0,1480 | 6,826 ± 0,129 ^{ns} | 6,854 ± 0,152 ^{ns} | 6,294 ± 0,381 ^{ns} |
| HTC (%) | 37,200 ± 1,036 | 36,120 ± 0,598 ^{ns} | 35,640 ± 0,850 ^{ns} | 32,440 ± 2,464 ^{ns} |
| PLT (10³/mm³) | 691,333 ± 30,203 | 671,4 ± 11,155 ^{ns} | 692 ± 14,415 ^{ns} | 650,200 ± 51,776 ^{ns} |
| HGB (g/dL) | 13,533 ± 0,323 | 13,200 ± 0,278 ^{ns} | 13,300 ± 0,313 ^{ns} | 11,920 ± 0,847 ^{ns} |
| VGM (fL) | 53,153 ± 0,424 | 52,920 ± 0,692 ^{ns} | 52,000 ± 0,669 ^{ns} | 51,320 ± 1,135 ^{ns} |
| MCH (pg) | 19,360 ± 0,180 | 19,460 ± 0,193 ^{ns} | 19,400 ± 0,089 ^{ns} | 18,880 ± 0,272 ^{ns} |
| MCHC (g/dL) | 36,460 ± 0,229 | 36,820 ± 0,239 ^{ns} | 37,380 ± 0,339 ^{ns} | 36,840 ± 0,411 ^{ns} |
| Mâles | | | | |
| GB (10³/mm³) | 10,92 ± 1,143 | 7,880 ± 0,974 ^{ns} | 7,800 ± 0,441 ^{ns} | 7,700 ± 0,175* |
| GR (10⁶/mm³) | 7,562 ± 0,095 | 7,488 ± 0,118 ^{ns} | 7,654 ± 0,196 ^{ns} | 7,495 ± 0,076 ^{ns} |
| HTC (%) | 38,180 ± 0,689 | 36,980 ± 0,703 ^{ns} | 38,160 ± 0,884 ^{ns} | 37,025 ± 1,012 ^{ns} |
| PLT (10³/mm³) | 737,200 ± 22,155 | 650,600 ± 7,763 ^{ns} | 554 ± 108,760 ^{ns} | 632,500 ± 19,032 ^{ns} |
| HGB (g/dL) | 14,240 ± 0,175 | 14,120 ± 0,220 ^{ns} | 14,420 ± 0,356 ^{ns} | 14,100 ± 0,216 ^{ns} |
| VGM (fL) | 50,420 ± 0,357 | 49,400 ± 0,451 ^{ns} | 49,820 ± 0,566 ^{ns} | 49,375 ± 1,011 ^{ns} |
| MCH (pg) | 18,82 ± 0,0716 | 18,84 ± 0,040 ^{ns} | 18,84 ± 0,103 ^{ns} | 18,775 ± 0,117 ^{ns} |
| MCHC (g/dL) | 37,340 ± 0,253 | 38,160 ± 0,269 ^{ns} | 37,820 ± 0,293 ^{ns} | 38,150 ± 0,575 ^{ns} |
| MPV (fL) | 6,220 ± 0,086 | 6,22 ± 0,066 ^{ns} | 6,48 ± 0,153 ^{ns} | 6,275 ± 0,092 ^{ns} |

valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM (n=5) (ns: non significatif, *P<0.05), comparés avec le groupe témoin, GR: globules rouges, GB: globule blancs, HTC: hématocrite, PLT: plaquettes, HGB: hémoglobine VGM:volume globulaire moyenne, MCH: concentration moyenne d'hémoglobine, MCHC: concentration moyenne d'hémoglobine corpusculaire, MPV: volume moyen des plaquettes.

Pour les paramètres hématologiques, aucun changement significatif n'a été observé chez les rats mâles au cours de cette étude (Tableau 22), sauf pour le nombre des GB (globules blancs)

chez les rats mâles traités avec la dose (1200 mg/kg) ont été diminués d'une manière significative ($p < 0,05$) par rapport au groupe témoin. Les résultats hématologiques sont présentés dans le tableau 22 chez les groupes des rats mâles et femelles ayant reçu les doses 300, 600 et 1200 mg/kg de l'extrait (AQ) pendant 30 jours.

Le système hématopoïétique est l'une des cibles les plus sensibles aux produits chimiques toxiques et un indice important de l'état physiologique et pathologique chez l'homme et l'animal. Dans cette étude, les données des paramètres hématologiques n'ont montré aucune différence significative entre le groupe témoin et les groupes traités, ce qui indique que l'extrait (AQ) n'a pas d'effets lorsqu'il est administré à long terme sur la circulation des cellules sanguines ou sur leur production (Li et al., 2010).

La diminution des GB (globules blancs) observée peut avoir résulté de la suppression de la leucocytose par l'extrait et aussi de la suppression de leur production dans la moelle osseuse (Ikpi et Nku, 2008)

Swenson et Reece (1993) ont indiqué que les plantes toxiques ne produisent pas d'effet direct sur les GB et leurs indices fonctionnels. La diminution du nombre total de globules blancs pourrait entraîner de la suppression de la leucopoïèse dans la moelle osseuse et selon Afolayan et Yakubu (2009) pourrait avoir les effets consécutifs sur le système immunitaire et l'activité phagocytaire des cellules sanguines des animaux.

IV.2.5. Paramètres biochimiques

L'analyse biochimique du sérum des rats mâles et femelles traités avec l'extrait (AQ) à différentes doses (300, 600 et 1200 mg/kg) est présentée dans le Tableau 23.

Chez les rats femelles après l'administration de la dose la plus élevée qui est 1200 mg/kg d'extrait (AQ), les niveaux de l'acide urique (AU) et le triglycéride (TRIG) ont augmenté de manière significative ($p < 0,001$). Tandis que les niveaux de cholestérol (CHOL) et ALAT chez les rats mâles ont nettement augmenté ($p < 0,001$), par rapport au groupe contrôle. Les valeurs de Na^+ chez les mâles traités avec 1200 mg/kg de l'extrait (AQ) ont augmenté de manière significative ($p < 0,05$), tandis que les concentrations de K^+ chez les femelles traitées avec la même dose ont augmenté de manière significative ($p < 0,01$). Les valeurs de l'urée, créatinine, phosphatase alcaline, aspartate aminotransférase, taux de glucose, albumine et le

Résultats et discussion

billan protidique ne présentaient pas de changements significatifs ($p > 0,05$) chez les animaux mâles et femelles traités par rapport au groupe contrôle comme montre le Tableau 23.

Tableau 23: Paramètres biochimiques chez rats femelles et mâles après un traitement de 30 jours.

| Paramètres | Contrôle | 300 mg/kg | 600 mg/kg | 1200 mg/kg |
|--------------------------|------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Femelles | | | | |
| AU (g/L) | 6,590 ± 0,517 | 9,390 ± 0,7500* | 7,990 ± 0,512 ^{ns} | 7,57 ± 0,491 ^{ns} |
| ALAT (U/L) | 40,500 ± 0,750 | 45 ± 3,102 ^{ns} | 40,500 ± 0,612 ^{ns} | 41,750 ± 1,634 ^{ns} |
| ASAT (U/L) | 88,68 ± 2,698 | 98,86 ± 1,402 ^{ns} | 81,18 ± 3,344 ^{ns} | 76,80 ± 2,103 ^{ns} |
| PAL (U/L) | 116,500 ± 23,055 | 73,330 ± 3,208 ^{ns} | 104,66 ± 4,546 ^{ns} | 78 ± 10,105 ^{ns} |
| BIL D | 0,047 ± 0,032 | 0,360 ± 0,214 ^{ns} | 0,100 ± 0,012 ^{ns} | 0,070 ± 0,019 ^{ns} |
| BIL T | 0,195 ± 0,078 | 0,510 ± 0,263 ^{ns} | 0,320 ± 0,050 ^{ns} | 0,320 ± 0,044 ^{ns} |
| GLUC (g/L) | 1,240 ± 0,070 | 1,205 ± 0,060 ^{ns} | 1,230 ± 0,083 ^{ns} | 1,180 ± 0,055 ^{ns} |
| UREE (g/L) | 0,550 ± 0,021 | 0,530 ± 0,008 ^{ns} | 0,530 ± 0,024 ^{ns} | 0,470 ± 0,025 ^{ns} |
| CREA (mg/L) | 6,560 ± 0,134 | 6,680 ± 0,151 ^{ns} | 6,550 ± 0,113 ^{ns} | 6,005 ± 0,164 ^{ns} |
| Na ⁺ (mmol/L) | 143,750 ± 0,960 | 140,250 ± 0,739 ^{ns} | 140 ± 1,541 ^{ns} | 140,25 ± 0,414 ^{ns} |
| K ⁺ (mmol/L) | 4,275 ± 0,021 | 5 ± 0,183** | 4,73 ± 0,073 ^{ns} | 4,32 ± 0,108 ^{ns} |
| CHOL (g/L) | 0,530 ± 0,041 | 0,470 ± 0,028 ^{ns} | 0,550 ± 0,056 ^{ns} | 0,530 ± 0,042 ^{ns} |
| TRIG (g/L) | 0,420 ± 0,031 | 0,550 ± 0,053 ^{ns} | 0,710 ± 0,040 ^{ns} | 0,950 ± 0,073 ^{a**} |
| ALB (g/L) | 39,600 ± 0,603 | 38 ± 0,671 ^{ns} | 27,400 ± 7,475 ^{ns} | 38,550 ± 1,581 ^{ns} |
| PT (g/L) | 76,470 ± 0,592 | 72,370 ± 0,842 ^{ns} | 72,680 ± 0,350 ^{ns} | 73,437 ± 1,483 ^{ns} |
| Mâles | | | | |
| AU (g/L) | 8,946 ± 0,332 | 7,687 ± 0,519 ^{ns} | 7,155 ± 0,583 ^{ns} | 8,420 ± 0,822 ^{ns} |
| ALAT (U/L) | 32,330 ± 1,020 | 40,250 ± 2,161 ^{ns} | 40,750 ± 1,634 ^{ns} | 59,370 ± 0,204 ^{***} |
| ASAT (U/L) | 100,640 ± 2,986 | 94,052 ± 1,561 ^{ns} | 94,420 ± 1,007 ^{ns} | 107,253 ± 3,450 ^{ns} |
| PAL (U/L) | 132 ± 3,984 | 158,66 ± 0,735 ^{ns} | 171 ± 10,541 ^{ns} | 169,33 ± 15,641 ^{ns} |
| BIL D | 0,160 ± 0,044 | 0,085 ± 0,022 ^{ns} | 0,205 ± 0,070 ^{ns} | 0,016 ± 0,002 ^{ns} |

Résultats et discussion

| | | | | |
|---------------------|-----------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| BIL T | 0,300 ± 0,032 | 0,176 ± 0,086 ^{ns} | 0,330 ± 0,050 ^{ns} | 0,090 ± 0,023 ^{ns} |
| GLUC (g/L) | 0,850 ± 0,268 | 1,037 ± 0,044 ^{ns} | 1,035 ± 0,051 ^{ns} | 0,960 ± 0,028 ^{ns} |
| UREE (g/L) | 0,530 ± 0,051 | 0,640 ± 0,020 ^{ns} | 0,570 ± 0,015 ^{ns} | 0,543 ± 0,011 ^{ns} |
| CREA (mg/L) | 6,393 ± 0,130 | 6,950 ± 0,216 ^{ns} | 6,912 ± 0,121 ^{ns} | 6,980 ± 0,016 ^{ns} |
| Na+ (mmol/L) | 129,330 ± 2,406 | 135,500 ± 2,512 ^{ns} | 134,750 ± 0,739 ^{ns} | 138,660 ± 0,540 [*] |
| K+ (mmol/L) | 5,100 ± 0,122 | 4,700 ± 0,176 ^{ns} | 4,950 ± 0,125 ^{ns} | 5,400 ± 0,176 ^{ns} |
| CHOL (g/L) | 0,526 ± 0,020 | 0,600 ± 0,008 [*] | 0,570 ± 0,004 ^{ns} | 0,720 ± 0,018 ^{a***} |
| TRIG (g/L) | 0,570 ± 0,023 | 0,575 ± 0,025 ^{ns} | 0,620 ± 0,017 ^{ns} | 0,660 ± 0,033 ^{ns} |
| ALB (g/L) | 37,800 ± 1,112 | 38,350 ± 1,304 ^{ns} | 38,050 ± 1,073 ^{ns} | 40,830 ± 0,460 ^{ns} |
| PT (g/L) | 73,293 ± 1,474 | 72,680 ± 1,530 ^{ns} | 75,622 ± 1,353 ^{ns} | 78,250 ± 1,081 ^{ns} |

Valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM (n=4). (ns: non significatif, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001), AU: acide urique, ALAT: alaline aminotransférase, ASAT : aspartate aminotransférase, PAL: phosphatase alcaline, BIL D: bilirubine directe, BIL T : bilirubine total, GLUC : glucose, CREA: créatinine, Na+ : sodium, K+: potassium, CHOL: cholestérol, TRIG: triglycéride, ALB: albumine, PT: protéines totaux.

La fonction hépatique peut être évaluée par le métabolisme du glucose, la synthèse des protéines, la sécrétion biliaire, ou en évaluant les niveaux anormaux de protéines dans le sang pour indiquer si les cellules hépatiques sont endommagées (Peng et al., 2016). Certaines enzymes et protéines, dont l'ALT, l'AST, la gamma-glutamyltransférase et la bilirubine, sont connues comme des biomarqueurs sensibles de la fonction hépatocellulaire (Traesel et al., 2014). En cas de lésions hépatiques, les taux sériques d'AST et d'ALT augmentent (Ozer et al., 2008). En outre, l'élévation de ces enzymes est associée à la nécrose du foie, à l'hépatite et à la toxicité du foie, qui est un complément au diagnostic de la maladie hépatique (Uthnedosa et al., 2009).

Dans cette étude les taux de l'ALT à la dose 1200 mg/kg (chez les rats mâles) ont augmenté de façon remarquable (p < 0,05), ce qui suggère que la dose élevée de l'extrait (AQ) peut entraîner des lésions de tissu hépatique et des blessures, ces résultats sont en corrélation avec l'étude histologique du foie comme montre la (Figure 21. A4).

Un changement significatif a été observé dans les niveaux de cholestérol chez les mâles et le taux de triglycéride chez les femelles dans cette étude, cela suggère que l'extrait (AQ) à la dose 1200 mg/kg a un effet sur le métabolisme du cholestérol chez les rats. D'autre part-on

suppose que les constituants identifiés par CPG-MS montrent la présence des acides gras dans l'extrait ce qui induit l'augmentation des taux de cholestérol et de triglycéride.

Les taux élevés de cholestérol et de triglycérides sont un signe commun d'intoxication. Cette altération est due à une augmentation des taux de peroxydase lipidique et d'acides gras insaturés résultant de troubles biologiques et de la perte de l'intégrité structurelle de la membrane induisant la perturbation du métabolisme hépatique chez les rats (Mouffouk, 2018).

En outre, l'administration orale de l'extrait (AQ) n'a pas provoqué une augmentation de la créatinine, de l'urée sériques et PAL. Ces paramètres sont des marqueurs importants du dysfonctionnement rénal (Levey et *al.*, 2006 ; Gowda et *al.*, 2010). Par conséquent, cet extrait n'a pas induit une augmentation du catabolisme des protéines et n'a pas causé de dommages au mécanisme de filtration rénale. L'examen histologique du rein (Figure 21. B1-B4) a confirmé ces résultats. En fait, aucune modification structurelle de la zone corticale ou les capsules de Bowman ont été observées chez tous les rats traités avec cet extrait à différentes doses.

Le sodium (Na^+) est un cation présent dans tous les espaces tissulaires et sa concentration est associée à l'homéostasie osmotique. Le sodium plasmatique est normalement en équilibre avec l'excrétion rénale de sodium, la plupart des réabsorptions de sodium se produisant dans les tubules distaux et les canaux collecteurs du rein. Le sodium est augmenté lorsqu'il y a une forte perte de liquide qui épargne les électrolytes, ou avec un apport d'eau insuffisant (Washington et Van Hoosier, 2012). Le potassium (K^+) est principalement un cation intracellulaire qui est important pour le maintien du potentiel membranaire. Les niveaux de potassium intracellulaire et extracellulaire sont régulés par un mécanisme d'échange d'ions complexe et affectés par plusieurs composés, dont l'aldostérone, l'insuline et les catécholamines (Evans, 2009). Des taux plasmatiques élevés de potassium augmentent la sécrétion d'aldostérone des glandes surrénales et peut également provoquer des arythmies et un arrêt cardiaque (Washington et Van Hoosier, 2012). Tandis ce que dans notre étude on n'a pas remarqués ces symptômes.

il existe certaines études qui suggèrent que des taux élevés d'AU pourraient contribuer au développement et à la progression du dysfonctionnement rénal (Saito et *al.*, 1978 ; Kang et

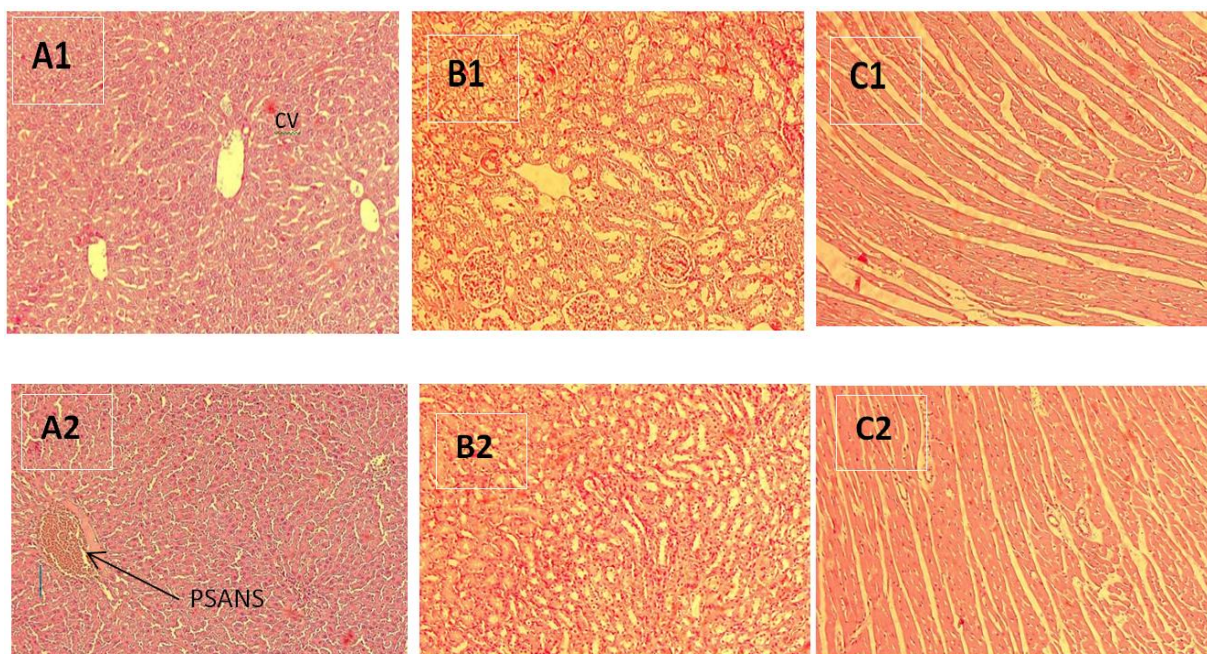
al., 2002). D'autre part les concentrations d'AU peuvent augmenter dans une tentative de bloquer la peroxydation des lipides et d'autres phénomènes connexes (Nieto *et al.*, 2000).

IV.2.6. Etude histologique

L'évaluation histopathologique des organes foie, reins et cœur est présentée dans la (Figure 21).

La coupe histologique du foie des rats traités avec l'extrait (AQ) (300 mg/kg) a montré des congestions vasculaires (CV) modérées et des portites subaiguës non spécifiques (PSANS) pour les doses les plus élevées (600 et 1200 mg/kg). La congestion sinusoidale (CS) a également été observée chez le groupe des rats mâle traité avec 1200 mg/kg. Cependant, La paroi cardiaque n'a montré aucun changement histologique pertinent chez les rats mâles et femelles ayant reçu les différentes doses de l'extrait (AQ) (300, 600 et 1200 mg/kg) pendant 30 jours, avec une architecture conservée (fibres musculaires striées régulières) (Figure 21. C1-C4). Le parenchyme rénal présentait une morphologie normale et aucun signe de lésion, sauf discrètes congestions vasculaires (CV) (Figure 21. B1-B4) cela est en corrélation avec les dosages des enzymes rénaux.

Par contre la présence de congestions vasculaires sur les sections du foie pourrait être due à l'action de la vasoconstriction de l'extrait (AQ) sur les parois des vaisseaux sanguins (Ashley, 2004).



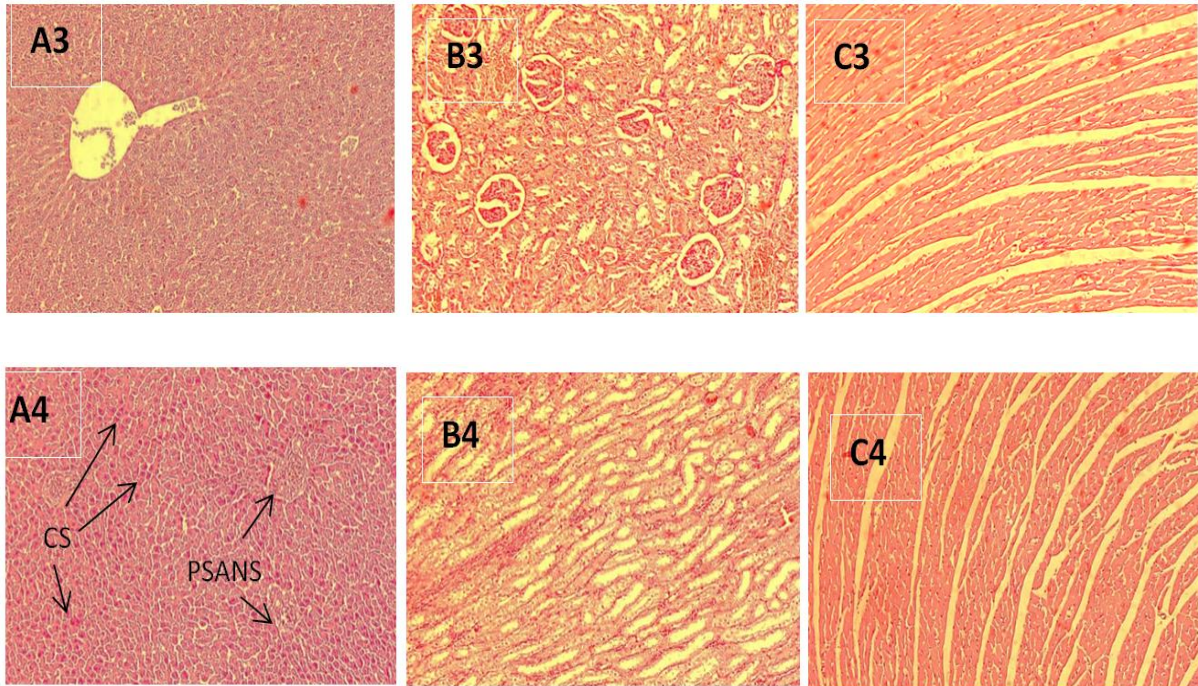


Figure 12: Résultats histopathologiques des organes (foie, reins et cœur) chez les rats après administration orale de l'extrait (AQ) pendant 30 jours. Le foie : A1 (témoin) ; A2 (300 mg/kg) ; A3 (600 mg/kg) ; A4 (1200 mg/kg). Reins : B1 (contrôle) ; B2 (300 mg/kg) ; B3 (600 mg/kg) ; B4 (1200 mg/kg). Cœur : C1 (contrôle) ; C2 (300 mg/kg) ; C3 (600 mg/kg) ; C4 (1200 mg/kg). CV: congestion vasculaire, PSANS: portites subaigüe non spécifique, CS: congestion sinusoidale (HE $\times 100$).

IV.3. Toxicité chronique

IV.3.1. Poids corporel, consommation alimentaire et consommation d'eau

Les résultats de l'évolution du poids corporel après le traitement des rats mâles et femelles par l'extrait (AQ) à différentes doses (300, 600 et 1200 mg/kg) pendant 90 jours sont présentés dans le Tableau 24.

Chez les rats femelles on a observé une augmentation non significative du poids corporel lorsque ils sont traités par les différentes doses de l'extrait (AQ), ainsi chez le groupe traités avec la dose 1200mg/kg on note une augmentation significative ($p < 0,05$) pendant les deux premier mois.

Tableau 24: Poids corporels chez les rats femelles et mâles pendant 90 jours de traitement.

| Jours | Témoin | 300 mg/kg | 600 mg/kg | 1200 mg/kg |
|-----------------------------|----------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Femelles | | | | |
| Avant traitement | 164,340 ± 2,63 | 167,500 ± 2,44 ^{ns} | 174,720 ± 3,66 [*] | 191,140 ± 2,18 ^{***} |
| 1^{er} mois | 198,90 ± 4,33 | 208,56 ± 5,03 ^{ns} | 210,92 ± 5,69 ^{ns} | 223,20 ± 4,36 [*] |
| 2^{eme} mois | 207,85 ± 6,81 | 225,38 ± 8,73 ^{ns} | 225,58 ± 7,17 ^{ns} | 239,76 ± 8,89 [*] |
| 3^{eme} mois | 221,15 ± 6,77 | 235,80 ± 7,49 ^{ns} | 233,74 ± 7,96 ^{ns} | 239,32 ± 11,66 ^{ns} |
| Mâles | | | | |
| Avant traitement | 180,64 ± 6,47 | 205,42 ± 2,72 ^{**} | 208,86 ± 3,51 ^{***} | 219,28 ± 7,48 ^{***} |
| 1^{er} mois | 270,18 ± 13,53 | 263,44 ± 8,77 ^{ns} | 275,84 ± 9,78 ^{ns} | 286,30 ± 10,00 ^{ns} |
| 2^{eme} mois | 298,34 ± 15,60 | 300,38 ± 9,43 ^{ns} | 312,92 ± 13,87 ^{ns} | 318,15 ± 15,46 ^{ns} |
| 3^{eme} mois | 318,90 ± 20,85 | 316,26 ± 11,34 ^{ns} | 329,28 ± 15,41 ^{ns} | 326,45 ± 18,42 ^{ns} |

Valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM (n=5), (ns: non significatif, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001) comparés avec le groupe témoin.

Chez les rats mâles avant le traitement par l'extrait (AQ) il y avait un changement significatif entre les différents groupes. Mais juste après l'administration de l'extrait (AQ), on note une augmentation non significative du poids corporel dans tous les groupes traités par rapport au lot témoin pendant les 90 jours de traitement. Ces résultats sont en corrélation avec la consommation alimentaire et la consommation d'eau comme représente les Figures 22, 23.

La consommation alimentaire et la consommation d'eau a augmenté de manière significative chez les rats femelles pendant les 90 jours de traitement. Alors que chez les rats mâles la consommation alimentaire et la consommation d'eau a augmenté mais surtout en 3^{eme} mois, elle était significative chez le groupe traité avec la dose 1200 mg/kg en comparaison avec les témoins comme représente les Figures 22 et 23.

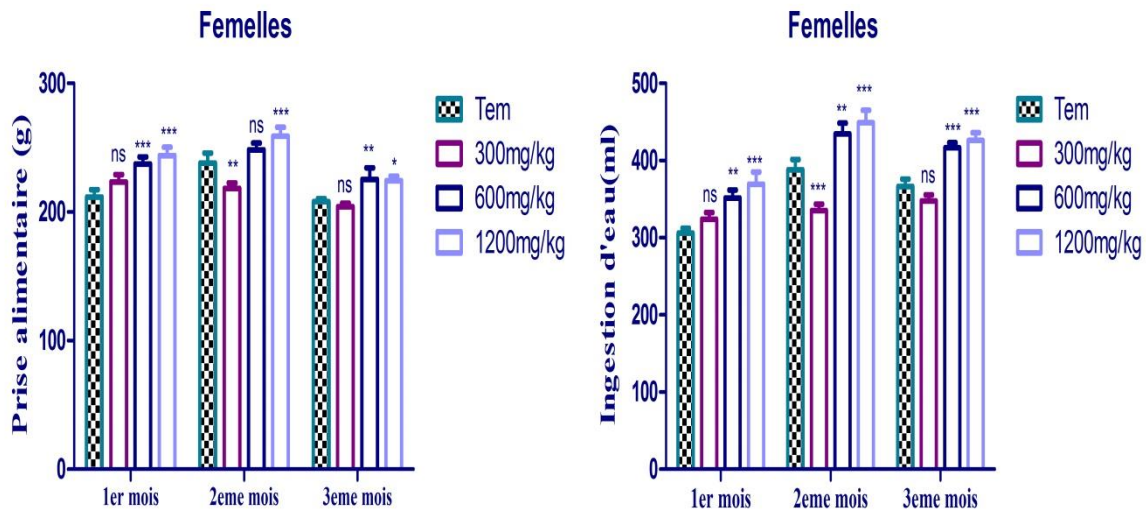


Figure 13: Prise alimentaire et l'ingestion d'eau pour les rats femelles Traités avec l'extrait (AQ) pendant 90 jrs. (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001) comparés avec le groupe témoin.

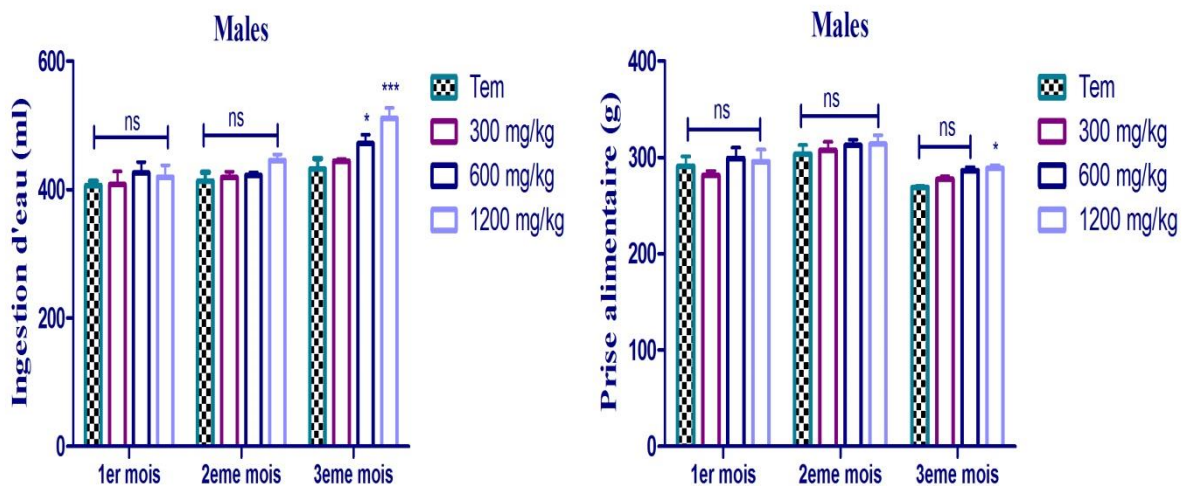


Figure 14: Prise alimentaire et l'ingestion d'eau pour les rats mâles traités avec l'extrait (AQ) pendant 90 jrs. (ns : non significative, *P<0.05, ***P<0.001) comparés avec le groupe témoin.

L'augmentation progressive du poids corporel à des doses de 300, 600 et 1200 mg/kg des rats femelles et mâles pendant 90 jours d'administration de l'extrait (AQ) d'*E. nebrodensis* peut indiquer l'amélioration de l'état nutritionnel de l'animal. L'effet sur la réponse de croissance pourrait être le résultat d'une augmentation de l'apport en nourriture et en eau.

IV.3.2. Poids des organes

Tableau 25: Poids relatifs des organes chez les rats femelles et mâles après un traitement de 90 jours.

| Organes | Témoins | 300 mg/kg | 600 mg/kg | 1200 mg/kg |
|-------------------|---------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Femelles | | | | |
| Foie | 2,910 ± 0,181 | 2,960 ± 0,103 ^{ns} | 2,685 ± 0,064 ^{ns} | 2,933 ± 0,157 ^{ns} |
| Reins | 0,598 ± 0,031 | 0,595 ± 0,012 ^{ns} | 0,592 ± 0,032 ^{ns} | 0,598 ± 0,023 ^{ns} |
| Poumons | 0,686 ± 0,035 | 0,631 ± 0,035 ^{ns} | 0,608 ± 0,022 ^{ns} | 0,647 ± 0,031 ^{ns} |
| Cœur | 0,292 ± 0,014 | 0,285 ± 0,014 ^{ns} | 0,268 ± 0,005 ^{ns} | 0,284 ± 0,005 ^{ns} |
| Rate | 0,268 ± 0,012 | 0,291 ± 0,015 ^{ns} | 0,271 ± 0,018 ^{ns} | 0,276 ± 0,013 ^{ns} |
| Cerveau | 0,795 ± 0,027 | 0,811 ± 0,014 ^{ns} | 0,754 ± 0,036 ^{ns} | 0,756 ± 0,035 ^{ns} |
| Ovaires | 0,043 ± 0,003 | 0,132 ± 0,085 ^{ns} | 0,044 ± 0,004 ^{ns} | 0,041 ± 0,003 ^{ns} |
| Mâles | | | | |
| Foie | 2,560 ± 0,064 | 2,533 ± 0,022 ^{ns} | 2,627±0,023 ^{ns} | 2,551±0,113 ^{ns} |
| Reins | 0,548 ± 0,009 | 0,567 ± 0,014 ^{ns} | 0,570 ± 0,013 ^{ns} | 0,534 ± 0,020 ^{ns} |
| poumons | 0,542 ± 0,074 | 0,461 ± 0,012 ^{ns} | 0,515 ± 0,033 ^{ns} | 0,536 ± 0,017 ^{ns} |
| Cœur | 0,259 ± 0,008 | 0,279 ± 0,006 ^{ns} | 0,263 ± 0,006 ^{ns} | 0,281 ± 0,011 ^{ns} |
| Rate | 0,239 ± 0,021 | 0,214 ± 0,008 ^{ns} | 0,202 ± 0,002 ^{ns} | 0,235 ± 0,017 ^{ns} |
| cerveau | 0,638 ± 0,035 | 0,630 ± 0,017 ^{ns} | 0,595 ± 0,011 ^{ns} | 0,612 ± 0,027 ^{ns} |
| testicules | 1,068 ± 0,049 | 1,087 ± 0,036 ^{ns} | 1,091 ± 0,057 ^{ns} | 1,044 ± 0,046 ^{ns} |
| épididyme | 0,369 ± 0,018 | 0,414 ± 0,011 ^{ns} | 0,381 ± 0,016 ^{ns} | 0,361 ± 0,016 ^{ns} |
| Estomac | 0,551 ± 0,017 | 0,533 ± 0,025 ^{ns} | 0,553 ± 0,024 ^{ns} | 0,595 ± 0,033 ^{ns} |

Effet de l'extrait (AQ) sur le poids relatifs des organes des rats femelles, valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM (n=5). (ns: non significatif).

Résultats et discussion

L'administration orale de l'extrait (AQ) à différentes doses (300, 600 et 1200mg/kg) pendant 90 jours chez les rats mâles et femelles, n'a pas provoqué des modifications significatives de poids relatif des organes (foie, reins, cœur, poumons, rate, cerveau, testicules, épидидyme, ovaires) par rapport au groupe témoin (Tableau 25).

IV.3.3. Paramètres hématologiques

Tableau 26: Paramètres hématologiques chez rats femelles et mâles après un traitement de 90 jours.

| Paramètres | Contrôle | 300mg/kg | 600mg/kg | 1200mg/kg |
|--|------------------|--------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| Femelles | | | | |
| GB (10³/mm³) | 8,030 ± 0,515 | 7,060 ± 0,124 ^{ns} | 7,760 ± 0,240 ^{ns} | 7,330 ± 0,201 ^{ns} |
| GR (10⁶/mm³) | 7,450 ± 0,060 | 7,310 ± 0,163 ^{ns} | 7,200 ± 0,122 ^{ns} | 6,60 ± 0,080 ^{**} |
| HTC(%) | 39,720 ± 0,703 | 39,560 ± 0,480 ^{ns} | 38,860 ± 0,829 ^{ns} | 40,800 ± 0,658 ^{ns} |
| PLT (10³/mm³) | 766,330 ± 14,960 | 745,330 ± 11,695 ^{ns} | 764 ± 4,860 ^{ns} | 582,660 ± 20,107 ^{***} |
| HGB (g/dL) | 13,020 ± 0,167 | 12,600 ± 0,154 ^{ns} | 12,930 ± 0,320 ^{ns} | 13,475 ± 0,230 |
| VGM (fL) | 53,270 ± 0,574 | 55,875 ± 0,871 [*] | 53,930 ± 0,235 ^{ns} | 59,350 ± 0,053 ^{***} |
| MCH (pg) | 17,500 ± 0,136 | 18,450 ± 0,251 [*] | 17,930 ± 0,133 ^{ns} | 19,100 ± 0,035 ^{***} |
| MCHC (g/dL) | 32,870 ± 0,243 | 31,930 ± 0,201 ^{ns} | 33,300 ± 0,141 ^{ns} | 33 ± 0,247 ^{ns} |
| MPV (fL) | 6,250 ± 0,082 | 6,760 ± 0,020 ^{ns} | 6,230 ± 0,177 ^{ns} | 6,325 ± 0,089 ^{ns} |
| Mâles | | | | |
| GB (10³/mm³) | 10,800 ± 0,883 | 10,360 ± 0,559 ^{ns} | 10,160 ± 0,230 ^{ns} | 10,100 ± 0,613 ^{ns} |
| GR (10⁶/mm³) | 8,450 ± 0,123 | 8,290 ± 0,259 ^{ns} | 8,220 ± 0,120 ^{ns} | 7,700 ± 0,542 ^{ns} |
| HTC (%) | 43,700 ± 1,060 | 42,530 ± 1,054 ^{ns} | 43,100 ± 0,654 ^{ns} | 41,360 ± 3,300 ^{ns} |
| PLT (10³/mm³) | 710,000 ± 3,889 | 716,660 ± 25,836 ^{ns} | 600,66 ± 47,730 ^{ns} | 480,000 ± 3,724 ^{**} |
| HGB (g/dL) | 14,650 ± 0,229 | 14,36 ± 0,334 ^{ns} | 14,150 ± 0,340 ^{ns} | 14,000 ± 1,072 ^{ns} |
| VGM (fL) | 51,600 ± 0,494 | 51,330 ± 0,481 ^{ns} | 52,400 ± 0,247 ^{ns} | 53,430 ± 0,622 ^{ns} |
| MCH (pg) | 17,300 ± 0,035 | 17,120 ± 0,290 ^{ns} | 17,070 ± 0,238 ^{ns} | 18,130 ± 0,133 ^{ns} |

Résultats et discussion

| | | | | |
|--------------------|----------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| MCHC (g/dL) | 33,550 ± 0,265 | 34,200 ± 0,384 ^{ns} | 33,220 ± 0,427 ^{ns} | 33,930 ± 0,147 ^{ns} |
| MPV (fL) | 6,150 ± 0,017 | 6,200 ± 0,070 ^{ns} | 6,200 ± 0,061 ^{ns} | 6,600 ± 0,127 [*] |

Valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM (n=4), (ns: non significatif, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001) comparés avec le groupe témoin, GR: globules rouges, GB: globule blancs, HTC: hématocrite, PLT: plaquettes, HGB: hémoglobine, VGM: volume globulaire moyenne, MCH: concentration moyenne d'hémoglobine, MCHC: concentration moyenne d'hémoglobine corpusculaire, MPV: volume moyen des plaquettes.

Les résultats hématologiques sont présentés dans le tableau 26 chez les groupes des rats ayant reçu les doses de 300, 600 et 1200 mg/kg de l'extrait (AQ) d'*E. nebrodensis* pendant 90 jours.

Les valeurs des plaquettes étaient significativement plus faibles chez les rats mâles et femelles, tandis que seuls les rats femelles présentaient une diminution significative des valeurs de GR (globules rouges) ($p < 0,01$). L'administration de la dose 1200 mg/kg de l'extrait (AQ) chez les rats femelles avaient considérablement augmenté les valeurs ($p < 0,001$) de VGM (volume globulaire moyenne) et MCH (concentration moyenne d'hémoglobine) par rapport à celle du groupe contrôle. D'autre part on n'a pas observé de différence significative des autres paramètres hématologiques comme le nombre des globules blancs, hématocrite et l'hémoglobine dans les groupes traités par l'extrait (AQ) à différentes doses par rapport au groupe témoin.

Les paramètres hématopoïétiques sont considérés comme les plus sensibles aux effets toxiques des substances et pourraient être utilisés pour évaluer l'état physiologique et pathologique chez les humains et les animaux (Li et al., 2010).

Une augmentation significative de la MCH et la VGM dans le groupe des rats femelles ayant reçu 1200 mg/kg, et la cause possible de cette diminution c'est la macrocytose qui est présente en cas d'anémie causé par un déficit en acide folique et vitamines (B12 et B9).

La diminution du taux des plaquettes des rats traités avec la dose (1200 mg/kg) par rapport aux témoins indique que l'extrait aqueux a un effet sur la production des plaquettes ou induit à la thrombopénie (réduction du nombre de plaquettes dans le sang). Cet effet est parmi les preuves d'effets toxiques sur l'hématopoïèse. En outre, avec une diminution du nombre de plaquettes, il y a un risque accru de saignements (Slichter, 2004). Ces résultats sont en corrélation à ceux de James et al. (2010) qui rapportent que le taux des plaquettes diminue chez les rats et les souris femelles après injection de l'extrait aqueux de *Polygala fruticosa*.

Les réductions observées dans la numération plaquettaire peuvent altérer la réparation de minuscules ruptures dans les capillaires et autres (Guyton et Hall, 2006). Par conséquent, la suite d'administration de l'extrait (AQ) à des doses élevées peut entraîner des hémorragies étendues comme il a été constatées dans l'histologie (Figure 24) en raison d'un déficit de coagulation, car les plaquettes jouent un rôle crucial dans la réduction des pertes sanguines et la réparation vasculaire (Adedapo *et al.*, 2007 ; Dahlbäck, 2008).

La diminution observée du nombre d'érythrocytes dans les groupes traités pourrait être due à l'effet suppressif de certains composants dans l'extrait sur la moelle osseuse. Ces composants tels que les alcaloïdes, les saponines, les flavonoïdes, les tanins et les phénols (Muller, 1980), il a peut-être supprimé les facteurs de croissance et de différenciation dans la moelle osseuse.

Une autre raison probable de la diminution observée du nombre d'érythrocytes peut être due à l'hémolyse causée par les composants phytochimiques de l'extrait, ou peut-être l'échec de la production d'érythropoïétine causé par l'extrait. Cela pourrait conduire à l'anémie (Ikpi et Nku, 2008). Tandis que l'hémolyse de l'échantillon de sang peut entraîner une diminution du nombre de globules rouges (Melillo, 2007).

IV.3.4. Paramètres biochimiques

Le traitement avec l'extrait (AQ) à différentes doses n'a pas provoquer des modifications significative des paramètres biochimiques (ALAT, ASAT, PAL, GLU, CHOL, TRIG, ALB, PT et Ca^{2+}) chez les rats femelles comparer au groupe témoin, c'est-à-dire reflétant des métabolismes glucidique, lipidique et protéique normaux. Par contre on a observé une diminution significative ($p < 0,05$) de la créatinine à la dose 1200 mg/kg (Tableau 27).

L'analyse biochimique du sérum des rats mâles et femelles traités avec l'extrait(AQ) à différentes doses (300, 600 et 1200 mg/kg) est présentée dans le Tableau 27.

Chez les rats mâles après l'administration de dose plus élevées 1200 mg/kg de l'extrait (AQ), les niveaux d'ALAT et La phosphatase alcaline (PAL) ont augmenté de manière significative. Tandis que le taux de la créatinine (CREA) a été augmenté d'une façon très significatif ($p < 0,01$), pour toutes les doses par rapport au groupe contrôle.

Résultats et discussion

Tableau 27: Paramètres biochimiques des chez rats femelles et mâles après un traitement de 90 jours.

| Paramètres | Contrôle | 300 mg/kg | 600 mg/kg | 1200 mg/kg |
|------------------------------|-----------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Femelles | | | | |
| AU (g/L) | 11,39 ± 1,580 | 10,870 ± 0,590 ^{ns} | 8,162 ± 0,289 ^{ns} | 12,590 ± 0,660 ^{ns} |
| ALAT (U/L) | 29,445 ± 2,142 | 32,254 ± 2,810 ^{ns} | 32,704 ± 1,532 ^{ns} | 32,932 ± 3,393 ^{ns} |
| ASAT (U/L) | 85,432 ± 2,338 | 76,740 ± 3,634 ^{ns} | 90,880 ± 4,765 ^{ns} | 105,865 ± 8,580 ^{ns} |
| PAL (U/L) | 77,980 ± 9,972 | 96,144 ± 27,361 ^{ns} | 98,480 ± 11,169 ^{ns} | 114,645 ± 10,214 ^{ns} |
| GLUC (g/L) | 0,762 ± 0,077 | 0,818 ± 0,027 ^{ns} | 0,614 ± 0,058 ^{ns} | 0,622 ± 0,055 ^{ns} |
| CREA (mg/L) | 6,982 ± 0,259 | 6,597 ± 0,203 ^{ns} | 6,844 ± 0,223 ^{ns} | 5,956 ± 0,178* |
| CHOL (g/L) | 0,512 ± 0,032 | 0,518 ± 0,054 ^{ns} | 0,470 ± 0,038 ^{ns} | 0,557 ± 0,043 |
| TRIG (g/L) | 0,397 ± 0,024 | 0,402 ± 0,036 ^{ns} | 0,288 ± 0,027 ^{ns} | 0,405 ± 0,072 ^{ns} |
| ALB (g/L) | 38,885 ± 0,560 | 36,386 ± 1,038 ^{ns} | 36,616 ± 0,461 ^{ns} | 36,125 ± 0,554 ^{ns} |
| PT (g/L) | 83,477 ± 1,070 | 78,604 ± 2,098 ^{ns} | 80,940 ± 1,669 ^{ns} | 77,977 ± 1,333 ^{ns} |
| CA ²⁺ (mmol/L) | 95,750 ± 2,251 | 95,800 ± 2,010 ^{ns} | 100,400 ± 2,892 ^{ns} | 97,800 ± 6,544 ^{ns} |
| Males | | | | |
| AU (g/L) | 7,912 ± 0,795 | 12,800 ± 2,556 ^{ns} | 10,600 ± 1,500 ^{ns} | 14,200 ± 0,325 ^{ns} |
| ALAT (U/L) | 35,307 ± 2,015 | 26,320 ± 0,708 ^{ns} | 36,500 ± 2,066 ^{ns} | 45,772 ± 3,319* |
| ASAT (U/L) | 103,972 ± 4,604 | 110 ± 8,636 ^{ns} | 109 ± 2,881 ^{ns} | 112 ± 7,225 ^{ns} |
| PAL (U/L) | 166,475 ± 9,577 | 200 ± 15,360 | 241,762 ± 4,638** | 277,300 ± 4,069** |
| GLUC (g/L) | 0,756 ± 0,045 | 0,590 ± 0,065 ^{ns} | 0,630 ± 0,052 ^{ns} | 0,560 ± 0,099 ^{ns} |
| CREA (mg/L) | 6,855 ± 0,279 | 5,047 ± 0,312*** | 5,530 ± 0,042** | 5,520 ± 0,048** |
| CHOL (g/L) | 0,437 ± 0,007 | 0,510 ± 0,039 ^{ns} | 0,480 ± 0,045 ^{ns} | 0,560 ± 0,010 ^{ns} |
| TRIG (g/L) | 0,412 ± 0,018 | 0,470 ± 0,032 ^{ns} | 0,340 ± 0,040 ^{ns} | 0,340 ± 0,068 ^{ns} |
| ALB (g/L) | 34,758 ± 1,222 | 35,500 ± 0,608 ^{ns} | 36,200 ± 0,451 ^{ns} | 35,500 ± 0,363 ^{ns} |
| PT (g/L) | 74,342 ± 1,010 | 75,600 ± 2,299 ^{ns} | 78,300 ± 1,954 ^{ns} | 80,500 ± 1,525 ^{ns} |
| CA ⁺² (mmol/L) | 97,250 ± 2,733 | 103 ± 4,358 ^{ns} | 106 ± 2,308 ^{ns} | 105 ± 2,066 ^{ns} |

Valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM (n=5) (ns: non significatif, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001) comparées au groupe témoin, AU: acide urique, ALAT: alaline aminotransférase, ASAT: aspartate aminotransférase, PAL: phosphatase alcaline, GLUC: glucose, CREA: créatinine, CHOL: cholestérol, TRIG: triglycéride, ALB : albumine, PT: protéines totaux, CA⁺²: calcium.

Le foie et les reins sont des cibles fréquentes de l'action antidrogue, car le foie est le principal organe de biotransformation des médicaments et les reins sont les principaux organes d'excrétion des produits chimiques (Ezeja et *al.*, 2014).

L'augmentation des transaminases et de la phosphatase alcaline est une indication claire de fuite cellulaire et de perte d'intégrité fonctionnelle de la membrane résultant d'une atteinte hépatique (Zeashan et *al.*, 2008). Seule l'ALT est remarquablement spécifique pour le foie puisque l'AST est principalement présente dans le myocarde, les muscles squelettiques, le cerveau et les reins (McIntyre et Rosaki, 1987 ; Witthawaskul et *al.*, 2003).

En général avec une maladie du foie, les taux sériques d'AST et d'ALT augmentent et diminuent en même temps (Sacher et *al.*, 1991). La créatinine est connue comme un indicateur efficace de la fonction rénale et toute augmentation du taux de créatinine est observée si est une atteinte marquée aux néphrons fonctionnels (Lameire et *al.*, 2005).

IV.3.5. Etude histologique

Des coupes histologiques du foie, rein et cœur des rats du groupe témoin et les groupes traités avec les doses (300, 600 et 1200 mg/kg) ont été analysées. Comme le montre la Figure 24.

Le parenchyme hépatique du groupe témoin et les groupes traités sont un peu congestif. À la dose la plus forte on a observé une portite subaiguë non spécifique (PSANS) chez les rats mâles et femelle (Figure 24. F4), ces résultats sont en corrélation avec l'augmentation de taux sérique d'ALAT.

L'observation microscopique des reins a révélé la présence de légères congestions vasculaires (CV) pour tous les groupes traités et non traités. A la dose la plus élevée on a remarqué une inflammation importante qui est la néphrite interstitielle subaiguë non spécifique (NISANS) (Figure 24. R4), ces résultats sont en corrélation avec l'augmentation de la créatinine et la phosphatase alcaline, qui sont des marqueurs spécifiques pour le fonctionnement rénale.

Tandis que le cœur ne présente aucune modification pathologique remarquable à toutes les doses étudiées (Figure 24. C1-C4).

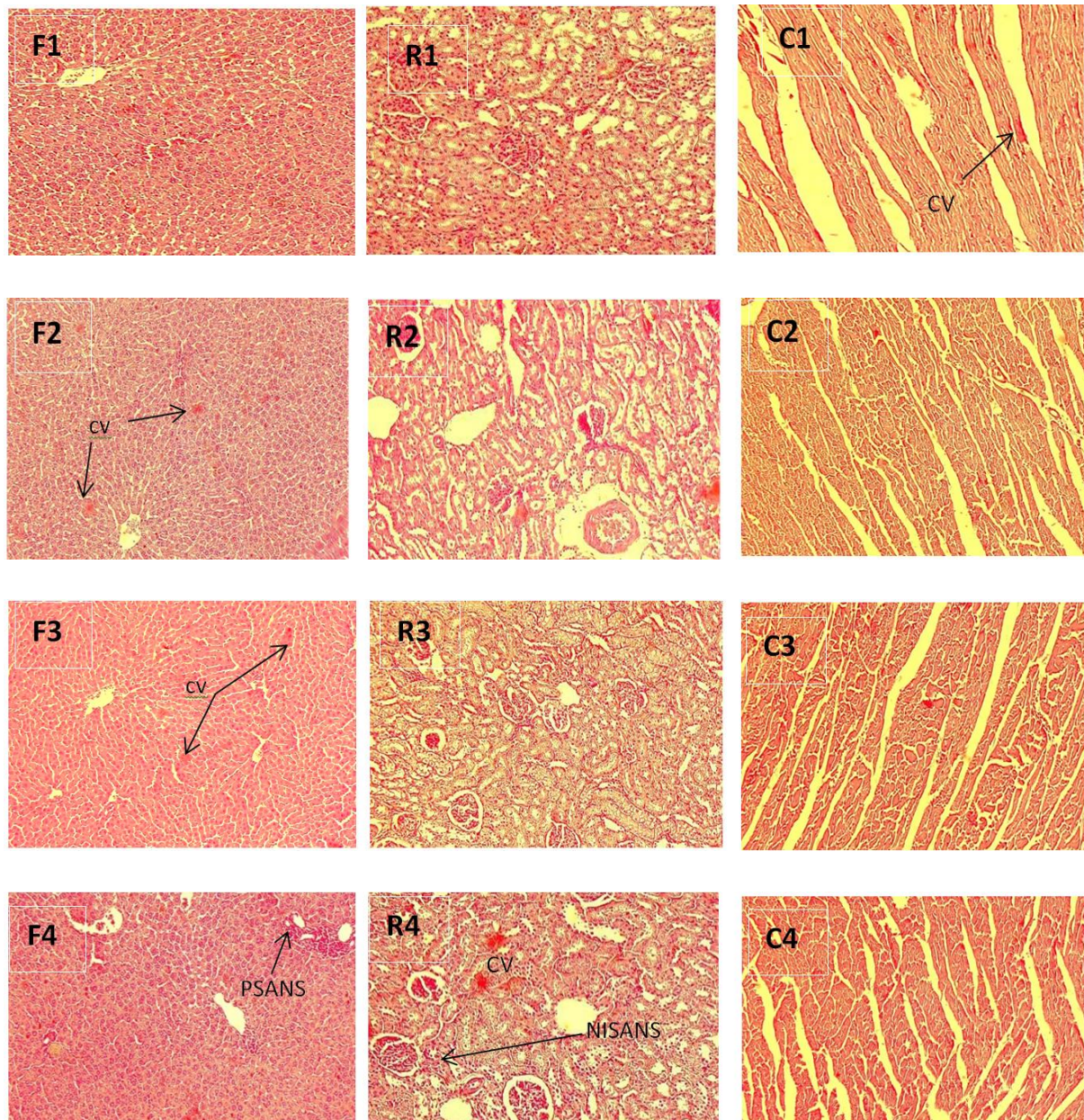


Figure 15: Résultats histopathologiques des organes (foie, reins et cœur) chez les rats après l'administration orale de l'extrait (AQ) pendant 90 jours. Le foie : F1 (témoin, HE 200×) ; F2 (300 mg/kg) ; F3 (600 mg/kg) ; F4 (1200 mg/kg). Reins : R1 (contrôle) ; R2 (1200 mg/kg). Cœur : C1 (contrôle) ; C2 (300 mg/kg) ; C3 (600 mg/kg) ; C4 (1200 mg/kg). CV : congestion vasculaire, PSANS : portite subaigüe non spécifique, NISANS : néphrite interstitiel subaigüe non spécifique (HE ×100).

V. Activité antioxydante

Les antioxydants tels que les flavonoïdes, les tanins, les coumarines, les substances phénoliques, les lignanes et les terpénoïdes sont présents dans divers produits végétaux (tels que les fruits, les feuilles, les graines et les huiles) (Jeong et *al.*, 2004). C'est pourquoi il existe

un intérêt croissant pour la séparation de ces antioxydants végétaux et de leur utilisation comme antioxydants naturels (Pinelo et al., 2004). De nombreuses études ont fait état d'un large éventail d'effets bénéfiques des composés phénoliques sur la santé, principalement par leurs activités antioxydantes (Zhang et al., 2015 ; Zhuo et al., 2016).

Étant donné qu'un seul protocole ne peut pas établir le potentiel antioxydant précis et complet d'un extrait naturel, il est préférable d'effectuer plusieurs essais agissant par des mécanismes divers. À cet égard, six essais biologiques ont été utilisés pour évaluer l'activité antioxydante des extraits d'*E. nebrodensis*.

Les propriétés de piégeage de la plante ont été évaluées par les tests DPPH, ABTS et β -carotène. Le DPPH est un radical libre stable qui présente une bande d'absorption à 517 nm. Son principe est que le DPPH, en acceptant un atome d'hydrogène d'un capteur d'antioxydants, se réduit en DPPH₂, changeant la couleur violette en jaune avec une diminution simultanée de l'absorbance. D'autre part, l'ABTS a l'avantage d'être soluble dans les solvants aqueux et organiques et utile pour évaluer la propriété antioxydante des échantillons dans différents milieux. Nous avons également déterminé le pouvoir réducteur des extraits en utilisant les essais FRAP et CUPRAC. Le dosage FRAP implique la réduction du Fe(III) en Fe(II) tandis que dans la méthode CUPRAC, le Cu(II) est réduit en Cu(I) par les antioxydants. De plus, l'effet de chélation des métaux des extraits a été déterminé.

Dans la présente étude, Les résultats de l'activité antioxydante des extraits d'*E. nebrodensis* sont présentés dans le tableau 28.

V.1. Activité anti radicalaire des extraits vis-à-vis DPPH et ABTS

L'extrait EtOAc et EtAce d'*E. nebrodensis* obtenu ont montré les activités de piégeage des radicaux les plus élevées avec (CI₅₀ : 10,10 et 11,93 μ g /mL pour le tests DPPH, respectivement) et (CI₅₀ : 5,56 et 6,32 μ g/mL pour test d'ABTS, respectivement). Cette forte activité de piégeage des radicaux libres est probablement liée à la présence des formes glycosidiques d'apigénine, de kaempférol, de quercétine et d'isorhamnétine et d'acide phénolique féruloylhexose qui sont déjà identifiés déjà dans les extraits. D'après Cao et al. (1997) et Yang et al. (2012). Ils ont été signalés que les groupes hydroxyles dans la structure des composés phénoliques sont les principaux contributeurs à l'activité antioxydante.

Cependant la plus faible activité a été constatée pour l'extrait (AQ) comme montre la figure 25. Ces résultats sont en accord avec de nombreuses études sur l'activité antioxydante des

extraits de plantes qui ont montré une corrélation linéaire significative entre la teneur totale en phénols et l'activité antioxydante. Ceci est particulièrement mis en évidence par le test DPPH (Yaici *et al.*, 2019 ; Bouaziz *et al.*, 2015).

En effet, les composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes sont reconnus comme des substances potentiellement antioxydantes ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène (Popovici *et al.*, 2010). L'effet scavenger des flavonoïdes est attribué à leur faible potentiel redox qui les rend thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres par un transfert d'atome d'hydrogène à partir des groupements hydroxyle (Siddhuraju et Becker, 2007 ; Ghedadba *et al.*, 2015). Donc on constate que les flavonoïdes identifiés dans les extraits de la plante pourraient être les principaux contributeurs à la capacité antioxydante.

L'étude de Ziani et ces collaborateurs (2018) ont montré que l'extrait éthanolique à 80 % d'*E. alata* de l'Algérie avait une activité de piégeage des radicaux nettement plus faible (CE_{50} : 540 $\mu\text{g/mL}$). Cependant, les extraits MeOH d'autres espèces d'*Ephedra* comme *E. gerardiana*, *E. laristanica* et *E. sarcocarpa* ont été étudiés pour leurs composés antioxydants naturels et ont montré une forte capacité antioxydante (Alali *et al.*, 2007 ; Rustaiyan *et al.*, 2011a ; Rustaiyan *et al.*, 2011b ; Khan *et al.*, 2017). Dans une autre étude de Mighri *et al.* (2019) ont évalué l'activité antioxydante de différents extraits d'*E. alata* de la Tunisie, les extraits BuOH et EtAce ont montré les activités les plus élevées contre le DPPH. Nos extraits sont plus actifs en comparaison avec l'activité de piégeage de la DPPH des extraits d'*E. pachyclada* qui ont une valeur CI_{50} de $55,53 \pm 0,5 \mu\text{g/mL}$ (Ghasemi *et al.*, 2014).

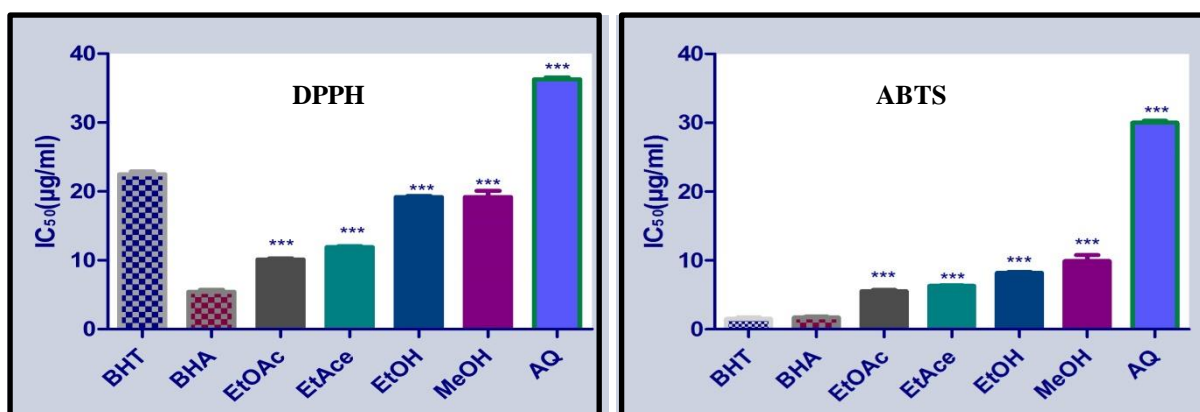


Figure 16: Activité scavenger vis-à-vis au DPPH et l'ABTS. Elle est représenté par des concentrations inhibitrices à 50% (CI_{50}) pour les standard : BHT, BHA et les extraits EtOAc : extrait acétate éthylique. EtAce : extrait Ethanol : acétone. EtOH : extrait éthanolique 70%. MeOH : extrait méthanolique 85%. AQ : extrait aqueux. Valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD (n=3). *** P < 0.001.

Les résultats de Rimawi et *al.* (2017) sur l'activité antioxydante des extraits d'*E. alata* de Palestine, elle était dans l'ordre suivant : 80 % d'éthanol > 100 % d'éthanol > eau, il y avait une forte corrélation entre les polyphénols et l'activité antioxydante mesurée par le DPPH et l'ABTS. En outre, Jaradat et *al.* (2015) ont signalé que l'extrait méthanolique d'*E. alata* de Palestine présentait des valeurs de EC₅₀ plus faibles.

V.2. Activité anti radicalaire des fractions vis-à-vis DPPH et ABTS

L'activité de piégeage des radicaux libres des cinq fractions a été étudiée avec des valeurs de CI₅₀ et de pourcentage d'inhibition en (%), les résultats sont indiqués dans le tableau 28. Le pourcentage d'activités de piégeage de DPPH varie de 63,627 ± 3,023 % à 96,635 ± 3,016 % par l'ordre décroissant suivant: FAE > FB > FA > FC > FH.

Pour les calculs des valeurs de la CI₅₀, les différentes concentrations des fractions ont été testées par rapport au radical DPPH et il a été constaté que FAE (CI₅₀ : 0,009 µg/mL), FA (CI₅₀ : 0,016 ± 0,000 µg/mL) et FC (CI₅₀ : 0,045 ± 0,000 µg/mL) sont les plus puissants parmi tous les échantillons par rapport au BHT.

Les résultats du test DPPH concordent avec la teneur en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins, où une tendance similaire a été observée. L'effet le plus faible sur le radical DPPH a été montré par la FH (0,3034 ± 0,0247 %), qui a un rendement un peu faible. Cependant, le pourcentage d'activité de piégeage du radical DPPH de la FAE (96,635 ± 3,016 %) et de la FA (95,426 ± 0,871 %) à 2 mg/mL est supérieur à celle du BHT (88,148 ± 0,900 %), ce qui indique que les piègeurs des radicaux les plus puissants trouvés dans l'*E. nebrodensis* sont de nature moyennement-polaire. Toutefois, cela peut être attribué à la condensation des composés actifs dans ces deux fractions et à l'élimination des autres composants. Un résultat équivalent a été rapporté dans le cas de *Lysimachia foenum-graecum* (Ghasemzadeh et *al.*, 2011) et *Codonopsis clematidea* (Bhardwaj et *al.*, 2020) où la FAE a montré une meilleure CI₅₀ par rapport aux autres fractions.

Dans la présente étude, on a constaté que l'activité scavenger des cinq fractions pour l'ABTS variait de 96,424 ± 0,171 % à 99,746 ± 0,071 % (Tableau 28). Le BHT a été utilisé comme Standard positif ayant une capacité remarquable de piégeage du radical libred'ABTS avec une inhibition de 98,672 ± 0,241 % à 100 µg/mL, ce qui est similaire à la FAE (99,453 ± 0,255 %) et à la FA (98,884 ± 0,331 %). Les résultats ont révélé que la FAE présentait la plus forte activité de piégeage des radicaux avec une CI₅₀ (0,004 ± 0,002 µg/mL), qui était

significativement proche de celle de BHT ($0,008 \pm 0,001 \mu\text{g/mL}$), suivie de la FA et la FC ($\text{CI}_{50} : 0,011 \pm 0,001 \mu\text{g/mL}$), ensuite la FB ($\text{CI}_{50} : 0,029 \pm 0,000 \mu\text{g/mL}$) et enfin de la FH ($\text{CI}_{50} : 0,071 \pm 0,003 \mu\text{g/mL}$).

Tableau 28: Tests de DPPH et ABTS de différentes fractions obtenues à partir de l'extrait d'éthanol 70% de la partie aérienne d'*E. nebrodensis*.

| FRACTIONS | % d'inhibition | CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) |
|----------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| <i>DPPH</i> | | |
| FH (20 mg/mL) | $93.627 \pm 3.023^*$ | $0.303 \pm 0.024^{***}$ |
| FC (4 mg/ mL) | $93.358 \pm 0.154^*$ | $0.045 \pm 0.000^{\text{ns}}$ |
| FAE (2 mg/ mL) | $96.635 \pm 3.016^{**}$ | $0.009 \pm 0.000^{\text{ns}}$ |
| FB (10 mg/ mL) | $95.721 \pm 0.715^{**}$ | $0.151 \pm 0.011^{***}$ |
| FA (2 mg/ mL) | $95.426 \pm 0.871^{**}$ | $0.016 \pm 0.000^{\text{ns}}$ |
| BHT (2 mg/ mL) | 88.148 ± 0.900 | 0.023 ± 0.001 |
| <i>ABTS</i> | | |
| FH (10 mg/mL) | $96.424 \pm 0.171^{***}$ | $0.071 \pm 0.003^{***}$ |
| FC (2 mg/mL) | $99.746 \pm 0.071^{\text{ns}}$ | $0.011 \pm 0.000^{\text{ns}}$ |
| FAE (1 mg/mL) | $99.453 \pm 0.255^{\text{ns}}$ | $0.004 \pm 0.002^{\text{ns}}$ |
| FB (4 mg/mL) | $99.226 \pm 0.156^{\text{ns}}$ | $0.029 \pm 0.000^*$ |
| FA (1 mg/mL) | $98.884 \pm 0.331^*$ | $0.011 \pm 0.001^{\text{ns}}$ |
| BHT (1 mg/mL) | 98.672 ± 0.241 | 0.008 ± 0.001 |

Les valeurs de la CI_{50} et du % d'inhibition représentent les moyennes \pm SD de trois mesures parallèles ($p \leq 0.05$) ; BHT : composé standard; FH : fraction d'hexane ; FC : fraction de chloroforme ; FAE : fraction d'acétate d'éthyle ; FB : fraction de *n*-butanol ; FA : fraction aqueuse (ns: non significatif, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

Le test d'ABTS est un test indépendant du pH, dans lequel la réduction des radicaux libres augmente avec l'augmentation des molécules antioxydantes (Liu et al., 2009). Les résultats de cette méthode sont en corrélation avec les valeurs TCP, TF et TT, comme pour le test DPPH. D'après les résultats on suggère que les effets montrés par la FAE, FA et FB respectivement, sur le radical ABTS pourraient prévenir ou améliorer les dommages oxydatifs. Les observations de notre étude correspondent à l'étude sur *Codonopsis clematidea* et *Ficus microcarpa* L. qui a révélé un modèle de performance identique pour la FAE parmi toutes les autres fractions étudiées (Bhardwaj et al., 2020 ; Ao et al., 2008).

V.3. Test de blanchiment du β -carotène des extraits

Le test β -carotène/acide linoléique a été utilisé pour évaluer l'effet antioxydant des extraits d'*E. nebrodensis*. Comme le montre le Tableau 29, les valeurs de la CI_{50} se sont avérées être dans l'ordre suivant : BHA < BHT < EtOAc < EtAce < EtOH < MeOH < AQ (Figure 26).

Divers études ont démontré que l'activité de blanchiment du β -carotène est en relation avec les teneurs en flavonoïdes et en polyphénols qui peuvent inhiber l'oxydation de l'acide linoléique et la formation d'hydroperoxydes (Duh et Yen, 1997 ; Sun, 2005).

On note aussi que les extraits EtOH et MeOH possèdent une forte activité, cependant l'extrait (AQ) représente l'extrait le moins actif avec une activité antioxydant égale $24,57 \pm 0,51$ $\mu\text{g/mL}$. On constate que les extraits les plus riches en composés phénoliques sont les extraits les plus actifs. Donc Il existe une forte corrélation entre la teneur en polyphénols, flavonoïdes et l'activité antipéroxydation lipidique des extraits d'*E. nebrodensis*. Selon Gao et ses collaborateurs (1998), les flavonoïdes et autres polyphénols ont la capacité de piéger les radicaux libres et par conséquent, retarder l'auto-oxydation des lipides. Il a été décrit que les propriétés réductrices sont généralement associés à la présence de structures réductrices, qui exercent une action antioxydante par rupture de la chaîne radicalaire en propagation en cédant des atomes d'hydrogènes (Dacosta, 2003).

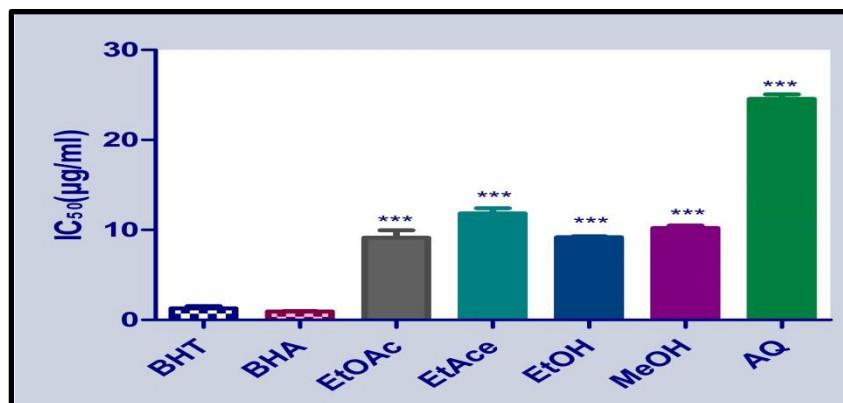


Figure 17: Test de blanchissement de β -carotène à 470 est représenté par des concentrations inhibitrices à 50% (CI_{50}) pour les extraits EtOAc : extrait acétate éthyle. EtAce : extrait ethanol :acétone. EtOH : extrait éthanolique 70%. MeOH : extrait méthanolique. AQ : extrait aqueux en comparaison avec BHT et BHA. Valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD (n=3). ***P<0.001.

V.4. Test de blanchiment du β -carotène des fractions

Le test β -carotène/acide linoléique a été utilisé pour évaluer l'effet antioxydant des fractions d'*E. nebrodensis*. Comme le montre la figure 27, les valeurs du pourcentage d'inhibition ont été trouvées dans l'ordre suivant: BHT < HF < FAE < FA < FC < FB (Figure27).

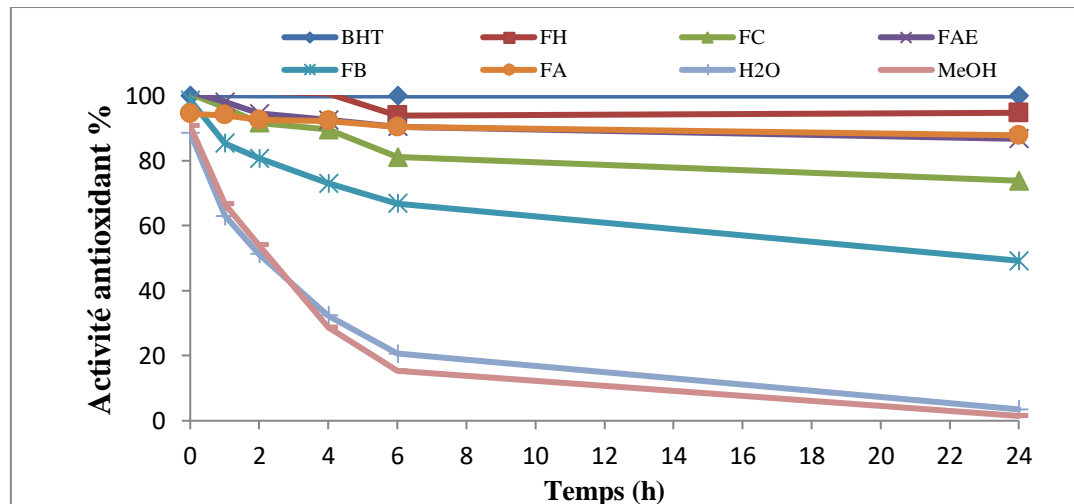


Figure 18: Cinétique du blanchiment du β -carotène en présence de FH, FC, FAE, FB, FA, eau, méthanol et BHT pendant 24h. FH : fraction d'hexane ; FC : fraction de chloroforme ; FAE : fraction d'acétate d'éthyle ; FB : fraction de *n*-butanol ; FA : fraction aqueuse; BHT : hydroxytoluène butylé ; MeOH : méthanol ; H2O : eau.

Les résultats obtenus pour le test de blanchiment du β -carotène peuvent être dus à la présence de polyphénols et des flavonoïdes qui ont la plus grande contribution au potentiel antioxydant des fractions de la partie aérienne. En fait, la littérature a démontré une bonne corrélation entre l'activité antioxydante et la teneur élevée en polyphénols et en flavonoïdes (Aouachriaa et al., 2017, Bouaziz et al., 2020).

V.5. Activité Anti-oxydante par le test de (CUPRAC)

Le test CUPRAC est un test relativement nouveau développé par Apak et al. (2008). Il utilise le réactif cuivre(II)-néocuproïne [Cu(II)-Nc] comme agent oxydant chromogène et repose sur la capacité de réduction cuivrique.

Cette méthode est utilisée pour évaluer le pouvoir réducteur des extraits d'*E. nebrodensis* (Tableau 29). Les résultats ont montré que la capacité réductrice des extraits est inférieure à celle de BHT et BHA ($CI_{50} = 3,64$ et $9,62 \mu\text{g/mL}$, respectivement). L'activité réductrice de l'extrait EtAce et EtOAc sont les plus puissants parmi les différents extraits avec une valeur de ($CI_{50} = 10,44$ et $11,33 \mu\text{g/mL}$, respectivement) suivi par EtOH et MeOH avec des (CI_{50} de

17,64 et 14,34 $\mu\text{g/mL}$, respectivement) comme représente la (Figure 28). Un pouvoir antioxydant élevé peut être attribué à la présence des flavonoïdes, tels que les flavan-3-ols (catéchine et epigallocatechine) et les flavonols (isorhamnitrine, kaempferol, quercétine) . La puissance antioxydante des flavonoïdes est approximativement proportionnelle et positivement affecté par la présence d'une fraction orto-dihydroxy dans le cycle B (Re et *al.*, 1999). Et enfin l'extrait (AQ) qui est le plus faible parmi ces extraits avec une CI_{50} d'environ 34,12 $\mu\text{g/mL}$ comme illustre (Figure 28), Cette faible activité pourrait être liée à la présence d'autres composés (par exemple les sucres, les acides aminés), non détectés par les procédures HPLC, qui pourraient d'une manière ou d'une autre interférer dans l'activité totale de l'extrait (Silva et *al.*, 2005).

L'étude de Rimawi et *al.*, (2017) montre que l'activité antioxydante par CUPRAC de la plante *E. alata* de Palestine augment dans l'ordre suivant : Ethanol 80 % > Ethanol 100 % > eau, ce qui correspond à la même tendance que l'activité antioxydante de FRAP, et le TCP mais différent du TF, ce qui suggère qu'il existe une corrélation entre le test de CUPRAC et le TCP.

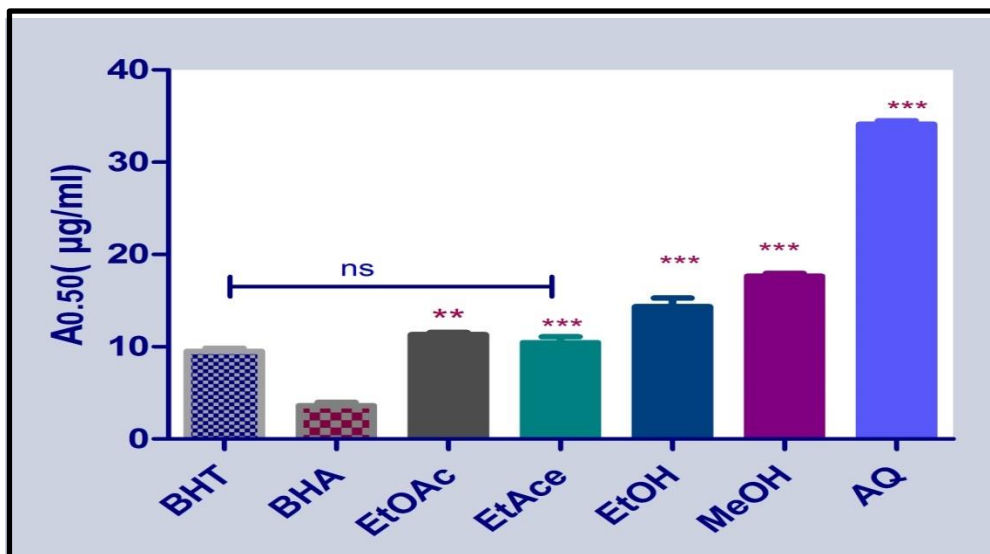


Figure 19: Test cuprac a été donné en $A_{0.50}$ ($\mu\text{g} / \text{mL}$) qui correspond à la concentration fournissant une absorbance de 0.50 de BHT. BHA et les extraits EtOAc : extrait acétate éthylique. EtAce : extrait éthanol :acétone. EtOH : extrait éthanologique 70%. MeOH : extrait méthanolique 85%. AQ : extrait aqueux. Valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD (n=3). ns : non significatif. (ns: non significatif, ***P<0.001).

V.6. Actiité Anti-oxydante par le test du pouvoir réducteur (FRAP) des extraits

Pour mesurer l'activité antioxydante des extraits on a utilisé un autre test qui est le pouvoir réducteur. Nous avons étudié la transformation de l'ion Fe^{3+} en Fe^{2+} en présence d'extraits qui ont servi d'indicateur de leur activité antioxydante (Olorunnisola et *al.*, 2012). La transformation de la couleur jaune du complexe Fe^{3+} /ferricyanure en bleu de Prusse de la forme ferreuse (Fe^{2+}) a été mesurée à 700 nm (Nur Alam et *al.*, 2013).

La figure 29 a révélé que l'activité antioxydante (FRAP) de la plante *E. nebrodensis* augmentait à mesure que les polyphénols et les flavonoïdes augmentent aussi, les valeurs FRAP des extraits sont de l'ordre suivant (EtOAc > EtAce > EtOH > MeOH >AQ). Cela signifié qu'il existe une corrélation claire entre l'AA (exprimé en FRAP) et la TCP et la TF.

Les valeurs obtenues avec les extraits EtOH, MeOH et AQ sont supérieures à celles trouvées par Rimawi et ces collaborateurs en (2017), mais ils ont trouvé que les extraits éthanoliques (100 % ou 80 %) donnent une forte AA par (FRAP) que l'eau comme solvant d'extraction. Ces résultats indiquent qu'il y a une corrélation ente l'activité antioxydante (test FRAP) et la TCP mais ne l'était pas avec la TF.

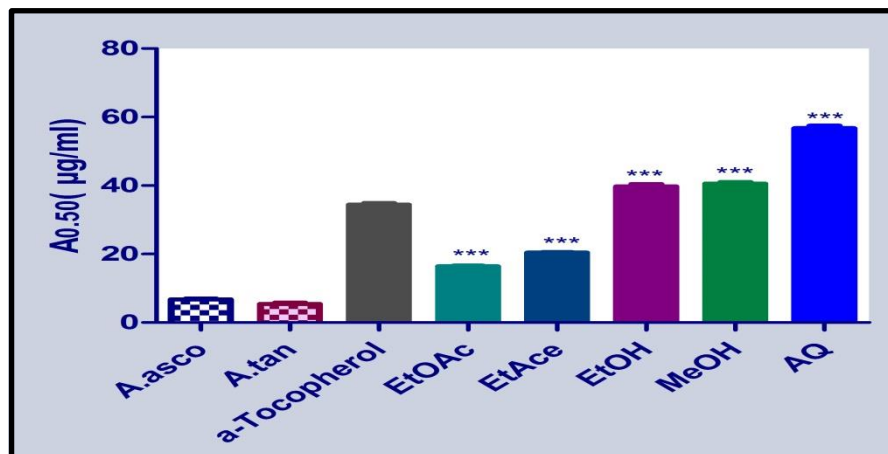


Figure 20: Pouvoir réducteur des extraits EtOAc : extrait acétate éthyle. EtAce : extrait éthanol :acétone. EtOH : extrait éthanolique 70%. MeOH : extrait méthanolique. AQ : extrait aqueux en comparaison avec A.asco : acide ascorbique. A.tan : acide tannique. Valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD (n=3). (***)P<0.001).

Parsaeimehr et *al.* (2010) ont étudié des espèces de culture sauvage d'Ephedra d'Iran (*E. procera* Fisch. & Mey, *E. pachyclada* Boiss et *E. strobilacea* Bunge), dans lesquelles l'extrait

méthanolique d'*E. strobilacea* s'est révélé un puissant antioxydant par rapport aux autres espèces lorsque il a été évalué par le test FRAP.

Les résultats de cette recherche sont plus encourageants par rapport à l'étude de Ziani et al. (2018) sur *E. alata* de l'Algérie, lorsqu'on compare nos résultats, on trouve qu'il y a une discordance concernant les extraits EtOH et AQ. Cette différence est probablement due à la l'effet de la région et des conditions climatiques, la saison de récolte affectant la biosynthèse des composés phénoliques, et les conditions d'extraction influencent aussi.

Mighri et al. (2019) montrent que les extraits de DCM et d'EAc ont les activités les plus fortes en utilisant la méthode FRAP. Cette différence pourrait être attribuée à la nature et aux quantités de composés phénoliques.

V.7. Activité Anti-oxydante par le test du pouvoir réducteur (FRAP) des fractions

On a observé que les valeurs du test FRAP sont rangeaient entre $0,005 \pm 0,000$ et $0,279 \pm 0,022$ $\mu\text{g/mL}$ (Figure.30). L'activité FRAP de La FAE, de la FA et de FC s'est avérée supérieure à celle d'autres échantillons avec une activité FRAP de $0,005 \pm 0,000$; $0,016 \pm 0,000$ et $0,025 \pm 0,001$ $\mu\text{g/mL}$ respectivement, par rapport à celle de la FB et de la FH ($0,088 \pm 0,002$ et $0,279 \pm 0,022$ $\mu\text{g/mL}$) respectivement. Ces résultats sont en bon accord avec les valeurs de TCP, TF, TT et les activités des radicaux libres (DPPH et ABTS). Les données obtenus dans ce test sont très similaires avec d'autres recherches qui ont observé que le test FRAP donnait des résultats analogues à ceux du test DPPH et l'ABTS (Bhardwaj et al., 2020 ; Jeong et al., 2011).

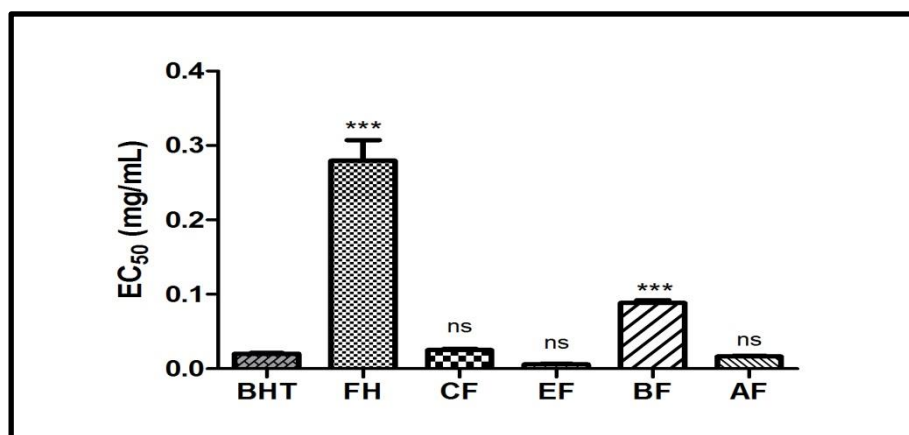


Figure 21: Une comparaison entre les différentes fractions dans le test de pouvoir réducteur. Les données ont été présentées sous forme d'EC₅₀. Moyennes \pm SD (n = 3). (ns: non significatif, *** p <0,001) par rapport au BHT comme standard.

V.8. Effet chélateur du fer ferreux

Dans le test de chélation des métaux, la ferrozine, un agent de chélation, réagit avec le chlorure ferreux (Fe^{2+}) et peut former quantitativement des complexes. Les complexes Ferrosine- Fe^{+2} ont produit un chromophore rouge qui peut être mesuré et donne une absorbance maximale à 562 nm. La présence d'un agent chélatant peut perturber la formation des complexes Ferrosine- Fe^{+2} et la couleur rouge disparaît (Gupta et al., 2014). La capacité de chélation des métaux des extraits d'*E. nebrodensis* sont présenté dans le tableau 29.

Les différents extraits ont exercé des effets chélateurs des métaux de transition selon l'ordre décroissant suivant : EtAce > EtOAc > EtOH > MeOH > AQ correspondant aux valeurs suivantes des IC_{50} : 197,61 ; 193,38 ; 174,60 ; 168,12 et 136,55 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivement. Comme montre la figure 31. Ces résultats sont loin d'être comparés avec l'EDTA (IC_{50} = 8,80 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Cela est dû à sa structure unique, il possède deux atomes d'azote et quatre atomes d'oxygène portant au fragment carboxyle, qui peut chélater les ions ferreux dans le centre et bloquer la formation d'un complexe Fe^{2+} -Ferrozine (Luo et al., 2011). Les extraits EtOAc et EtAce contiennent les teneurs les plus élevés des polyphénols et en flavonoïdes, respectivement. Cependant, ils sont les moins actifs. Donc on suggère qu'il n'y a pas une corrélation entre la quantité en polyphénols et en flavonoïdes et l'activité chélatrice des extraits d'*E. nebrodensis*. L'activité chélatrice des extraits peut être due à d'autres composés phytochimiques présents dans la plante.

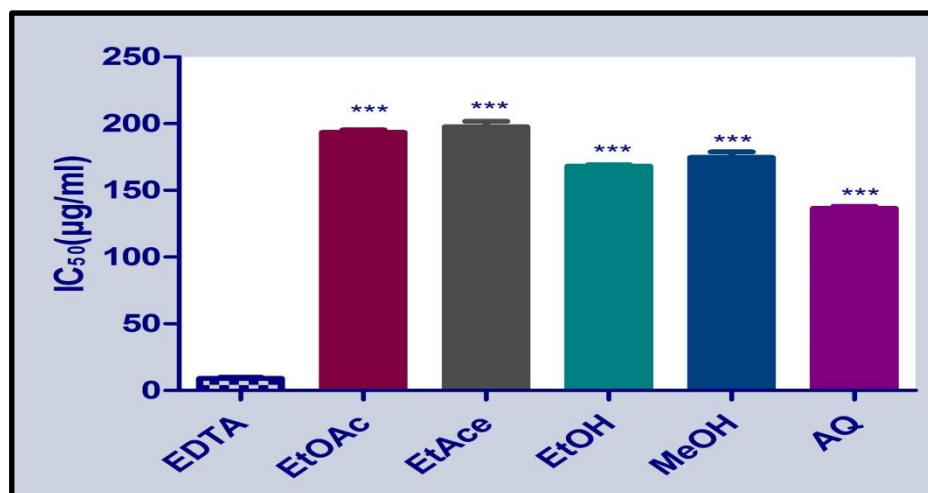


Figure 22: Activité chélation de fer est représenté par les concentrations inhibitrices à 50% (IC_{50}) pour les extraits EtOAc: extrait acétate éthylique. EtAce: extrait éthanol :acétone. EtOH: extrait éthanolique 70%. MeOH: extrait méthanolique 85%. AQ: extrait aqueux avec EDTA. Valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD (n=3). (***) $P < 0.001$.

Résultats et discussion

Tableau 29: Activité antioxydante *in vitro* des extraits d'*E. nebrodensis*.

| Extraits | CI ₅₀ (µg/mL) | | | | A _{0.5} (µg/mL) | |
|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------------|------------------|--------------------------|-------------------|
| | Activité scavenger par DPPH | Activité scavenger par ABTS | Test de blanchiment de B- carotène | Chélation de fer | Test CUPRAC | Pouvoir réducteur |
| EtOAc | 10,10 ± 0,17 | 5,56 ± 0,16 | 09,15 ± 0,83 | 193,38 ± 1,92 | 11,33 ± 0,22 | 16,45 ± 0,17 |
| EtAce | 11,93 ± 0,11 | 6,32 ± 0,11 | 11,83 ± 0,59 | 197,61 ± 4,09 | 10,44 ± 0,66 | 20,42 ± 0,14 |
| EtOH | 19,17 ± 0,90 | 8,22 ± 0,14 | 09,19 ± 0,10 | 174,60 ± 4,28 | 17,64 ± 0,34 | 39,77 ± 0,65 |
| MeOH | 19,18 ± 0,18 | 9,93 ± 0,85 | 10,21 ± 0,29 | 168,12 ± 1,13 | 14,34 ± 0,94 | 40,60 ± 0,42 |
| AQ | 36,29 ± 0,24 | 30,02 ± 0,28 | 24,57 ± 0,51 | 136,55 ± 1,45 | 34,12 ± 0,35 | 56,75 ± 0,74 |
| BHT^a | 22,32 ± 1,19 | 1,29 ± 0,30 | 1,05 ± 0,01 | - | 9,62 ± 0,87 | - |
| BHA^a | 5,73 ± 0,41 | 1,81 ± 0,10 | 0,90 ± 0,02 | - | 3,64 ± 0,19 | - |
| EDTA^a | - | - | - | 8,80 ± 0,47 | - | - |
| Acide asce^a | - | - | - | - | - | 6,77 ± 1,15 |
| Acide tan^a | - | - | - | - | - | 5,39 ± 0,91 |
| α-toco^a | - | - | - | - | - | 34,93 ± 2,38 |

IC₅₀ concentrations inhibitrices à 50% (CI₅₀) et **A_{0.50}** qui correspond à la concentration fournissant une absorbance de 0.500. Elles sont exprimés en (µg/mL) microgramme par millilitre pour les extraits **EtOAc** : extrait acétate éthyle. **EtAce**: extrait éthanol :acétone. **EtOH**: extrait éthanolique 70%. **MeOH**: extrait méthanolique 85%. **AQ**: extrait aqueux avec une comparaison avec les standards. ^a : BHA, BHT, EDTA, Acide ascorbique, α-tocoférol et Acide tannique : ils sont utilisés comme des standards. Chaque valeur est exprimée en moyenne ± SD (n=3).

VI. Activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase *in vitro*

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative du système nerveux central qui se développe progressivement. Actuellement, le seul traitement de cette maladie est constitué par les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase et de la butyrylcholinestérase. Plusieurs inhibiteurs synthétiques sont utilisés cliniquement, mais ils présentent une efficacité limitée et quelques effets secondaires, c'est pourquoi la recherche de nouveaux agents biologiquement actifs à partir de sources naturelles représente un domaine d'investigation prometteur (Gidaro *et al.*, 2015). C'est pourquoi les produits naturels qui possèdent des propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes ont été considérés comme de possibles agents neuroprotecteurs (Rawa *et al.*, 2019).

Le tableau 30 représente un résumé des activités anticholinestérasiques des extraits d'*E. nebrodensis* contre l'AchE et le BchE à 200 µg/mL. La plupart des extraits actifs présentaient une meilleure inhibition contre le BchE que l'AchE.

Les espèces d'*Ephedra* sont abondantes en composés phénolique spécialement les flavonoïdes, que l'on pense être responsables des activités inhibitrices (Amakura et al., 2013).

Selon Vinutha et ses collaborateurs (2007), les extraits sont classés comme de puissants inhibiteurs d'AchE s'ils ont la capacité d'inhiber plus de 50% de l'enzyme, l'activité inhibitrice d'AchE est modérée si l'extrait provoque une inhibition de 30 à 50% et faible si l'extrait inhibe moins de 30%. Cette étude actuelle décrit à la fois l'anti-AchE et l'anti-BchE d'*E. nebrodensis* avec de meilleurs résultats et une CI₅₀ plus basse. Les extraits EtAce et MeOH ont montré la plus forte inhibition de l'AchE avec une valeur de CI₅₀ (21,56 et 22,50 µg/mL) et CI₅₀ intéressante de (8,64 et 10,98 µg/mL) contre la BchE, respectivement (Tableau 30). L'extraction d'*E. nebrodensis* à l'aide de méthanol et le mélange alcoolique Ethanol : acétone pourrait fournir plus de constituants que l'utilisation de l'eau. La CI₅₀ la plus élevée signalée par l'extrait (AQ) qui a une faible activité inhibitrice de l'AchE mais une forte activité contre la BchE.

Tableau 30: Activité anticholinestérase *in vitro* des extraits d'*E. nebrodensis*.

| Extraits | Test AchE | | Test BchE | |
|-------------------------|----------------------------|---|----------------------------|---|
| | % d'inhibition à 200 µg/mL | CI ₅₀ (µg / mL) ^a | % d'inhibition à 200 µg/mL | CI ₅₀ (µg / mL) ^a |
| EtAce | 90,86 ± 0,99 | 21,56 ± 0,19 | 99,89 ± 2,09 | 8,64 ± 0,72 |
| MeOH | 91,33 ± 0,55 | 22,50 ± 0,29 | 99,27 ± 0,34 | 10,98 ± 0,07 |
| EtOAc | 87,10 ± 0,78 | 43,33 ± 1,63 | 98,36 ± 0,00 | 19,59 ± 0,73 |
| EtOH | 85,65 ± 0,53 | 43,73 ± 0,89 | 98,32 ± 0,75 | 23,35 ± 0,50 |
| AQ | 20,29 ± 6,13 | >200 | 94,03 ± 0,75 | 22,67 ± 1,09 |
| Galantamin ^B | 94,77 ± 0,34 | 6,27 ± 1,15 | 96,98 ± 2,38 | 11,70 ± 0,82 |

EtAce: extrait éthanol :acétone. MeOH: extrait méthanolique 85%. EtOAc: extrait acétate d'éthyle. EtOH : extrait éthanolique 70%. AQ : extrait aqueux.^B : composée standard.^a CI₅₀: concentrations inhibitrices à 50%, Chaque valeur est exprimée en moyenne ± SD (n=3), elle est exprimée en (µg/mL) microgramme par millilitre.

Il est important de souligner que la plupart des extraits ont montré une activité d'inhibition importante contre la BchE par rapport à l'AchE, comme montre le tableau 30, on a également remarqué que les extraits d'*E. nebrodensis* avaient une action inhibitrice variable contre l'AchE et la BchE. Cette activité est probablement due à la présence aux alcaloïdes dans les extraits (éphédrine, pseudoéphédrine et phénylpropanolamine) qui ont été identifiés dans cette étude par CPG-MS.

d'après notre étude sur *E. nebrodensis* on a identifié des flavonols (lutéolin et isorhamnitéine) dans les extraits MeOH et EA (Tableaux 15 et 18), des études d'ancrage moléculaire ont révélé que la lutéoline et l'isorhamnitéine sont liées toutes deux à l'AchE, montrant des scores d'ancrage de -8,940 et -8,644, respectivement, ce qui indique que le complexe ligand-enzyme est stable (Zhang et al., 2018). Du même, un groupe de chercheurs a précédemment signalé que l'isorhamnitéine avait une activité inhibitrice de l'AchE. aussi il a été signalé que la lutéoline inhibe de manière réversible la BchE (Katalinić et al., 2010).

Il est important de souligner que l'action inhibitrice des extraits d'*E. nebrodensis* sur l'AchE et le BchE pourrait être liée à l'action synergique de plusieurs substances actives plutôt qu'une seule molécule présente dans les extraits.

VII. Activité anti inflammatoire *in vitro*

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits d'*E. nebrodensis* a été évaluée par dénaturation de BSA (Bovine sérum albumine) et les résultats sont présentés dans la figure 32.

Les résultats actuels montrent que les extraits EtOH et EtAc ont la capacité d'inhiber la dénaturation des protéines induite thermiquement de manière dose-dépendante, ils ont donné des taux d'inhibition élevés de l'ordre de 82,99 et 78,92 %, respectivement à 20 mg/mL, suivis par les extraits MeOH et EtOAc avec un pourcentage d'inhibition 56,25 et 56,06 % .une concentration de 5 mg/mL, le diclofénac possède un effet anti-inflammatoire avec un pourcentage d'inhibition de 99,82 %. L'extrait (AQ) a un effet anti-inflammatoire modéré (16,43 %).

La dénaturation des protéines est un processus dans lequel les protéines perdent leurs structures secondaires et tertiaires en raison de l'altération de leurs liaisons hydrogène, hydrophobes, électrostatiques et disulfure. La plupart des protéines perdent leurs fonctions

biologiques après la dénaturation et induisent la production d'auto-antigènes, ce qui provoque plusieurs dysfonctionnements auto-immuns, notamment des maladies rhumatismales et inflammatoires. Par conséquent, les agents qui empêchent la dénaturation des protéines sont considérés comme d'importants médicaments antiarthritiques et anti-inflammatoires (Mouffouk et *al.*, 2018).

Le résultat de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* indique que la capacité des extraits hydro-alcoolique à maintenir la structure tridimensionnelle des protéines contrôlant la production d'auto-antigène. Cela peut être dû à la présence des principaux composés bioactifs présent dans cette espèce, notamment des polyphénols et des flavonoïdes.

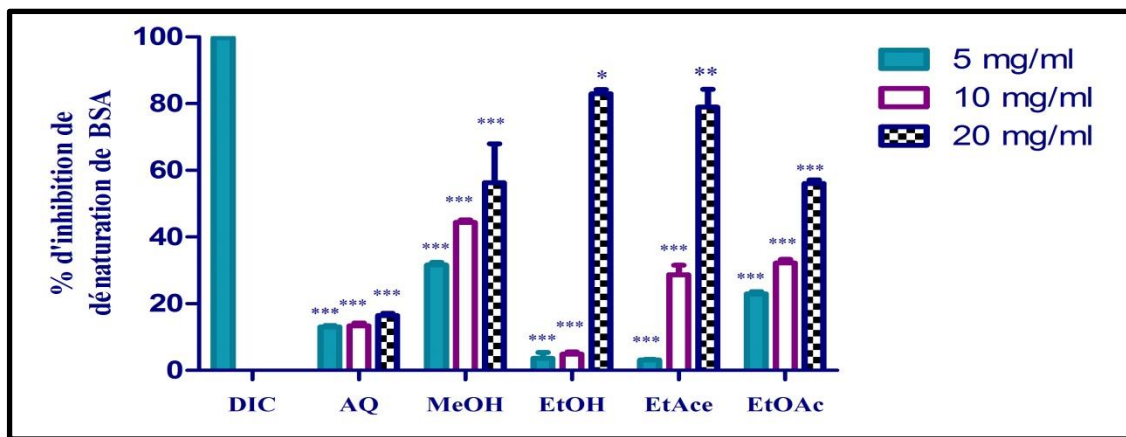


Figure 23: Activité anti inflammatoire *in vitro* est représenté par les pourcentages d'inhibition de la dénaturation de BSA pour les extraits EtOAc : extrait acétate éthylique. EtAce : extrait éthanol :acétone. EtOH : extrait éthanolique 70%. MeOH : extrait méthanolique 85%. AQ : extrait aqueux avec une comparaison avec DIC : diclofénac. Valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD (n=3). (* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001).

VIII. Activité anti-inflammatoire *in vivo*

L'huile de croton est connue pour ces propriétés irritantes et peut provoquer une inflammation, donc elle est choisie comme inducteur inflammatoire (Lan et *al.*, 2012). Cette huile a le mécanisme d'activer phospholipase A2, qui dégrade ensuite l'acide arachidonique à partir de la membrane cellulaire. Cet acide arachidonique est alors métabolisé en prostaglandine et leucotriène (Shah et *al.*, 2011). Ainsi, l'exposition cutanée à l'huile de croton, peut induire la production de ERO et une forte réaction inflammatoire cutanée similaire à celle qui se produit dans la dermatite de contact irritant (Khan et *al.*, 2012 ; Pinto et *al.*, 2015 ; Siddiqui et *al.*, 2016).

L'effet anti inflammatoire des extraits d'*E. nebrodensis* induit par l'application de l'huile de croton sur l'oreille est présentée dans la figure 33. Cette étude montre que l'œdème a été inhibé de manière dose-dépendante c'est à dire la dose la plus élevée qui donne une activité importante exercé par les extraits. Les extraits MeOH et EtOH permettent de réduire l'œdème de l'oreille avec un pourcentage d'inhibition le plus élevé (72,22 % et 70,37 %, respectivement) à 400 mg/kg, Cet effet a été statistiquement similaire à celle provoquée par l'indométacine 78,49 % ; l'effet topique des extraits AQ et EtOAc était modérée avec des pourcentages d'inhibition (48,14 % et 50,92 %, respectivement) à 400 mg/kg, statistiquement significative pour toutes les doses testées. Le traitement topique par l'extrait EtAce a montré un résultat statistiquement significatif à toutes les doses testées (200 et 400 mg/kg) avec une inhibition de l'œdème de l'oreille 36,11% et 37,96 %, respectivement comme illustre la figure 33. Cette activité anti-inflammatoire est probablement due aux alcaloïdes (éphedrine et pseudo-éphedrine) identifiées dans les extraits. Parce que les alcaloïdes sont les principaux composants de genre *Ephedra*. En outre, le composé Ephedroxane, structurellement similaire à l'éphédrine, qui a été isolé d'*E. sinica* et appartient aux dérivés de l'oxazolone, il est considéré comme un composé anti-inflammatoire (Zhang et al., 2018).

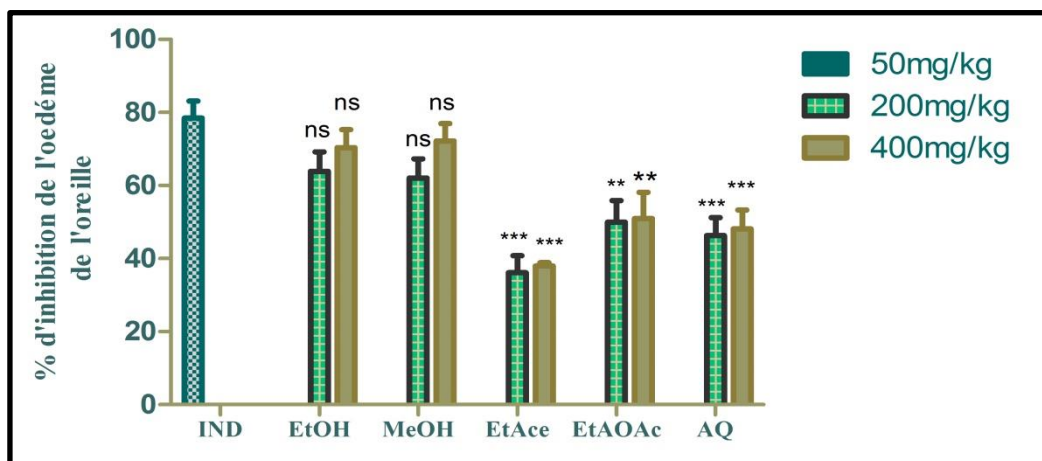


Figure 24: Effet des extraits d'*E.nebrodensis* sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez les souris. EtOH : extrait ethanolique 70%, MeOH : extrait méthanolique 85%, EtAce : extrait Ethanol:acétone, EtOAc : extrait acétate d'éthyl, AQ : extrait aqueux. IND : indométhacine: 50 mg/kg. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n=6). (ns: non significatif, ** P < 0.01, *** P < 0.001).

Dès 1985, il a été signalé que les analogues de l'éphédrine, qui comprend principalement l'éphédrine, la pseudoéphédrine et l'éphédroxane, ont eu une puissante activité anti-

inflammatoire *in vivo*. Cet effet anti-inflammatoire était probablement dû à l'inhibition de la biosynthèse de la prostaglandine E2 (Kasahara et *al.*, 1985).

Iksoo et ces collaborateurs, ont découvert que dans les extraits de racines d'éphédra, l'Ephédranine A et l'éphédranine B avaient des propriétés anti-inflammatoires. Ils pourraient supprimer la transcription du TNF- α et IL-1 β et inhibent l'inflammation induite par le LPS (lipopolysaccharide). Ils ont supprimé la translocation de NF- κ B et la phosphorylation de protéine activée par les mitogènes (PAM) p38 kinase (Iksoo et *al.*, 2010).

Le processus inflammatoire aiguë est caractérisé par la formation d'un œdème et l'infiltration de leucocytes au niveau des tissus enflammés. Tout d'abord, les substances chimiques libérées par les cellules résidentes favorisent l'altération de la perméabilité vasculaire et, par conséquent, la formation d'un œdème. Simultanément, les événements de séquence et les interactions entre l'endothélium et les cellules inflammatoires (principalement les neutrophiles) mènent au développement de ces cellules inflammatoires au niveau des lésions tissulaires (Koji et *al.*, 2009 ; Vestweber, 2015). Nous n'avons observé que l'application topique des extraits d'*E. nebrodensis* ainsi que l'indométacine, utilisée comme contrôle positif, inhibait la formation d'œdèmes auriculaires. En outre, l'activité anti-inflammatoire semble être due à différents mécanismes d'action, tels que l'inhibition de la libération d'histamine, cyclooxygénase inductible, 5-lipooxygénase et activités du complément et de l'élastase (Kapil et Sharma, 1995; Ringbom et *al.*, 1998 ; Diaz et *al.*, 2000 ; Ryu et *al.*, 2000).

les antioxydants obtenus à partir de sources végétales naturelles sont largement considérés comme une stratégie prometteuse pour la prévention ou l'atténuation des conditions inflammatoires de la peau, puisque ces agents peuvent protéger la peau des dommages oxydatifs et par conséquent, inhiber l'initiation et/ou l'amplification de processus inflammatoire (Sivaranjani et *al.*, 2013). Dans cette étude, nous avons effectué l'analyse phytochimique des extraits hydro-alcoolique et aqueux de la partie aérienne d'*E. nebrodensis* par la méthode HPLC-MS, où on a observé la présence des composés phénoliques particulièrement les flavonoïdes, aussi l'étude quantitative de ces extrais montre leurs richesse en tannins. De nombreuses études ont attribué l'activité anti-inflammatoire des constituants phénoliques à leur activité antioxydante (Middleton et *al.*, 2000 et Kassim et *al.*, 2010).

VIII. Activité analgésique

Les résultats présentés dans la figure 34 montrent que l'administration de 200 et 400 mg/kg des extraits d'*E. nebrodensis* ont exercés un effet protecteur vis-à-vis la douleur provoquée par l'acide acétique. Les extraits montrent une importante activité analgésique avec un pourcentage d'inhibition de 64,32 ; 63,74 ; 59,06 et 50,29 % pour les extraits (EtOAc, MeOH, EtOH et EtAce) à 200 mg/kg. Ainsi Le puissant effet inhibiteur des contractions abdominales est enregistré avec les extraits EtOAc, EtAce, MeOH et EtOH à la dose plus élevée (400 mg/kg). Dans l'ordre suivant : EtOAc 74,26% > EtAce 73,68% > MeOH 72,51 % > EtOH 70,76%. Ces effets sont proches à celle de l'aspirine à 100 mg/kg (79,14%). Il n'y avait aucune différence significative entre ces extraits à différentes concentrations et le contrôle de l'aspirine comme montre la figure 34. Tandis que l'extrait (AQ) à 200 mg/kg exerce l'effet le plus faible (24,56 %), mais il a un effet modéré (57,89 %) à 400 mg/kg comme illustre la figure 34. L'activité analgésique périphérique des différents extraits serait probablement due à la présence des composés phénoliques et les alcaloïdes. Ces composés sont en effet connus, comme doués de propriétés analgésiques dans d'autres plantes médicinales comme *Jasminum amplexicaule* et *Elephantopus tomentosus* (Jia et al., 2008; Yam et al., 2009).

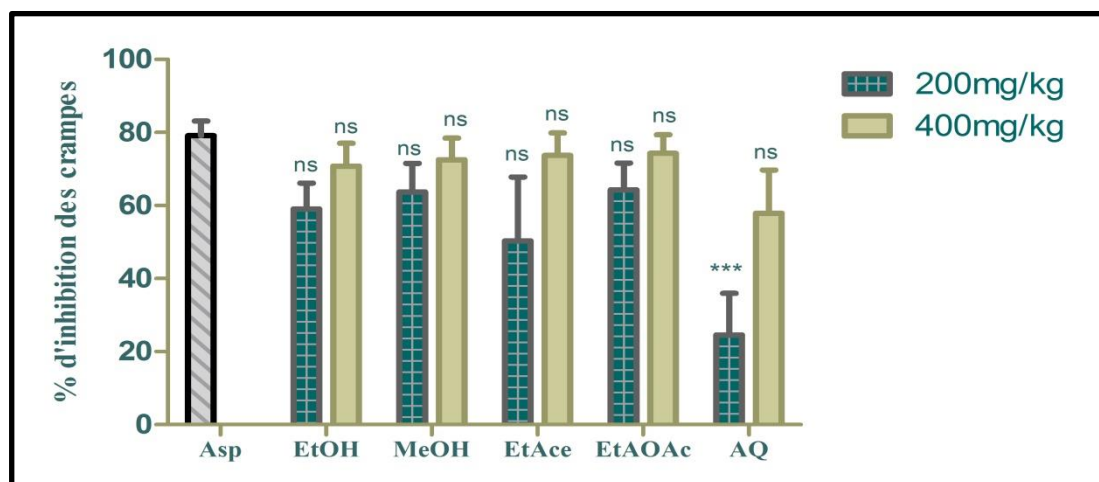


Figure 25: Pourcentage d'inhibition de la réponse nociceptive des extraits d'*E. nebrodensis*. EtOH: extrait éthanolique 70%, MeOH: extrait méthanolique 85 %, EtAce: extrait Ethanol :acétone, EtOAc: extrait acétate d'éthyle, AQ: extrait aqueux. ASP: Aspirine: 100 mg/kg. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n=6), (***) P < 0.001).

Dans le test à l'acide acétique, si les douleurs des muscles abdominaux ne constituent pas un modèle particulier, les douleurs musculaires involontaires de l'abdomen peuvent être dues à leurs similitudes avec certaines de celles connues pour les douleurs viscérales (Hajhashemi et

al., 2009). L'activation des prostaglandines, histamines, bridykinines, sérotonine, lipo-oxygénases (LOX), cyclo-oxygénases (COX) et cytokines endogènes, y compris l'IL-8, l'IL-1 β et le TNF- α , dans les tissus périphériques est déclenchée par l'injection intra-péritonéale d'acide acétique dans l'abdomen de souris (Lu et *al.*, 2007), qui pénètre souvent dans la corne dorsale du SNC (système nerveux central) et stimule les nocicepteurs primaires, ce qui entraîne une douleur enzymatique et un syndrome de torsion (Le Bars et *al.*, 2001). Dans notre observation expérimentale, les extraits hydro-alcooliques ont réduit de manière significative ($P < 0,001$) le nombre de contractions abdominales ou de torsions facilitées par l'acide acétique dans l'effet dose-dépendante. Ce résultat montre explicitement que l'antinociception générée par les extraits, puisqu'il empêche la synthèse endogène des milieux infamants, ou due aux récepteurs, est immédiatement bloquée (Franzotti et *al.*, 2000).

Conclusion et perspectives

Ephedra nebrodensis est une espèce appartenant à la famille (Ephedraceae), elle est utilisée en pharmacopée traditionnelle comme antiasthmatique, anticancéreux et hépato-protecteur, peu d'études se sont intéressées à ces propriétés pharmacologiques et aucune étude toxicologique n'a été menée sur cette espèce, il nous paraissait alors intéressant d'investiguer pour la première fois son étude toxicologique. Les résultats de l'analyse phytochimique (quantitative et qualitative) ont révélés que les extraits sont riches en polyphénols et contiennent notamment des alcaloïdes (éphédrine, pseudo-éphédrine et nor-éphédrine), des flavonols glycosidiques (Quercetin 3-*O*-rutinoside, Isorhamnetin 3-*O*-rutinoside et kaempferol 3-*O*-rhamnoside), flavonols non glycosidiques (Catéchine et epigallocatechine), des flavones glycosidiques (Apigenin 6-*C*-glucoside-7-*O*-glucoside et Apigenin-*C*-hexoside-*O*-pentoside) et des acides phénoliques (acide protocatechique, acide 4-*O*-caffeoylquinique, acide caféique et 5-Hydroxy feruloyl hexose).

La richesse des extraits d'*E. nebrodensis* en composés phénoliques nous a menée à explorer ces différentes activités biologiques et par conséquent justifier et confirmer ses indications thérapeutiques traditionnelles. Ils pourraient ainsi constituer une alternative à certains additifs de synthèse.

L'activité anti-oxydante a été évaluée par plusieurs tests *in vitro* (DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP, β -carotène et chélation de fer), les résultats ont montrés que les extraits EA et EtAce possèdent un pouvoir anti-oxydant important par contre l'extrait (AQ) possède un effet modéré. D'autre part, tous les extraits ont montrés une activité anti-cholinestérasique intéressante avec des pourcentages d'inhibition très élevés pour BchE par rapport à l'AchE et particulièrement l'extrait ethanol:acétone (EtAce) qui a donné le meilleur effet. Les extraits EtOH, EtAce et MeOH possèdent l'effet anti-inflammatoire *in vitro* le plus élevé avec un pourcentage d'inhibition variant de 56% à 82%. L'administration des souris par les extraits (400 mg/kg) a inhibée l'inflammation induite par l'huile de coton avec un pourcentage d'inhibition de 37,96% jusqu'à 72,22%. D'autre part le traitement des souris par les doses de 200 et 400 mg/kg montre une importante activité analgésique, les pourcentages d'inhibition sont de 50,29% à 74,26%.

Conclusion et perspectives

En fin l'évaluation de la toxicité de l'extrait (AQ) a permis donner un large vu sur le profil de toxicité à court et à long terme.

Les résultats obtenus dans le cadre de cette recherche peuvent être complétés par d'autres études :

-Séparer et isoler les différents composés identifiés dans l'espèce *E. nebrodensis* (surtout les composés phénoliques et les composés alcaloïdiques).

-Réaliser d'autres activités biologiques : antioxydante *in vivo*, anti-inflammatoire par d'autres modèles), anticancéreuse, cytotoxicité et antibactérienne.

Références

- Abdel-Salam O.M.E., Youness E.R et Hafez H.F. (2011). The antioxidant status of the plasma in patients with breast cancer undergoing chemotherapy. *OJMIP*, **1**: 29-35.
- Abourashed E., El-Alfy A., Khan I et Walker L. (2003). “Ephedra in perspective—a current review”. *Phytother Res*, **17**(7): 703–712.
- Adedapo A.A., Abatan M.O et Olorunsogo O.O. (2007). Effects of some plants of the spurge family on the haematological and biochemical parameters of rats. *Vet. Arhiv*, **77**(1): 29-38.
- Afolayan A.J et Yakubu M.T. (2009). Effect of *Bulbine natalensis* Baker stem extract on the functional indices and histology of the liver and kidney of male Wistar rats. *J. Med. Food*, **12**(4) 814-820.
- Aghdasi M., Mofid Bojnoordi M., Mianabadi M et Nadaf, M. (2016). Chemical components of the *Ephedra major* from Iran. *Nat Prod Res*, **30**(3): 369-371.
- Ahmad M., Khan M.P.Z., Mukhtar A., Zafar M., Sultana S et Jahan S. (2016). Ethnopharmacological survey on medicinal plants used in herbal drinks among the traditional communities of Pakistan. *J. Ethnopharmacol*, **184**: 154-186.
- Aichour R., Benzidane N., Arrar L., Charef N et Baghiani A. (2018). Hepatoprotective and antiinflammatory activities of Algerian *Capparis spinosa*. L. *Annual Research & Review in Biology*, **25**: 1-12.
- Ait El cadi M., Makram S., Ansar M., Khabbal Y., Alaoui K., Faouzi MA., Cherrah Y., Taoufik J., (2012). Anti-inflammatory activity of aqueous and ethanolic extracts of *Zygophyllum gaetulum*. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, **70**(2):113-116.
- Alali F., Tawaha K., El-Elimat T., Syouf M., El-Fayad M., Abulaila K., Nielsen S.J., Wheaton W.D., Falkinhamiii J.O et Oberlies N.H. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of aqueous and methanolic extracts of Jordanian plants: an ICBG project. *Nat. Prod. Res*, **21**(12): 1121-1131.
- Al-khateeb E., Al-Ani H., Al-Kadi., Al-Obaidi Essam D.F., Shalan et Al-Rawi N. (2014). Investigation of the Alkaloids of Two Ephedra Spp. Wildly Grown in Iraq. *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences*, **108**(3385): 1-8.
- Al-Rimawi F, Abu-Lafi S, Abbadi J, Alamarneh AAA, Sawahreh RA et Odeh I. (2017). Analysis of phenolic and flavonoids of wild *Ephedra alata* plant extracts by LC/PDA and LC/MS and their antioxidant activity. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, **14**(2): 130-141.
- Álvarez-Fernández M. A., Hornedo-Ortega R., Cerezo A. B., Troncoso A. M et García-Parrilla M. C. (2014). Non-anthocyanin phenolic compounds and antioxidant activity of beverages obtained by gluconic fermentation of strawberry. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **26**: 469–481.
- Amakura Y., Yoshimura M., Yamakami S., Yoshida T., Wakana D., Hyuga M., Hyuga S., Hanawa T., Goda, Y. (2013). Characterization of Phenolic Constituents from Ephedra Herb Extract. *Molecules*, **18**(5): 5326-5334.
- Amarowicz R et Pegg R.B. (2013). Inhibition of proliferation of human carcinoma cell lines by phenolic compounds from a bearberry-leaf crude extract and its fractions. *Journal of Functional Foods*, **5**(2): 660-667.
- Ammar I., Ben Salem M., Harrabi B., Mzid M., Bardaa S., Sahnoun Z., Attia H et Ennouria M. (2018). Anti-inflammatory activity and phenolic composition of prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) flowers. *Ind. Crops Prod*, **112**: 313–319.
- Angajala G et Radhakrishnan S. (2014). A review on nickel nanoparticles as effective therapeutic agents for inflammation. *Inflammation and Cell Signaling*, **1**(3): 1-8.

- Annappandian V.M., Sundaram R et Shanmuga. (2017). Phytochemical Evaluation and *In vitro* Antioxidant Activity of Various Solvent Extracts of *Leucas aspera* (Willd.) Link Leaves. *Free Radicals and Antioxidants*, **7**(2): 166-171.
- Ao C., Li A., Elzaawely A.A., Xuan T.D et Tawata S. (2008). Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of *Ficus microcarpa* L. Fil. Extract. *Food Control*, **19**(10): 940–948.
- Aoki K., Yamakuni T., Yoshida M et Ohizumi Y. (2005). Ephedrae herba decreases lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 protein expression and NF- κ B-dependent transcription in C6 rat glioma cells. *J Pharmacol Sci*, 0507080019-0507080019.
- Aouachriaa S., Boumerfeg S., Benslama A., Benbacha F., Guemmeza T., Khenouf S., Arrar L., Baghiani A. (2017). Acute, subacute toxicity and antioxidant activities (*in vitro* and *in vivo*) of *Reichardia picroide* crude extract. *Journal of Ethnopharmacol*, **208**:105–116.
- Aouissa I.W.R. (2002). Etudes des activités biologiques et de la toxicité aigüe de l'extrait aqueux des feuilles de *Mengifera Indical* (Anacardiaceae). Thèse de doctorat Pharmacie. Université de Bamako. P127.
- Apak R., Guclu K., Ozyurek M et Celik S.E. (2008). Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchim. Acta*, **160**(4): 413–419.
- Apak R., Guclu K., Ozyurek M et Karademir S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, Using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *J Agric Food Chem*, **52**(26): 7970–7981.
- Aquilano K., Baldelli S et Ciriolo M.R. (2014). Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Front Pharmacol*, **5**: 196.
- Aruoma O.I. (1998). Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **75**(2): 199-212.
- Ashley C. (2004). Renal failure: how drugs can damage the kidney. *Hospital Pharmacist*. **11**:48–53.
- Asmat U., Abad K et Ismail K. (2016). Diabetes mellitus and oxidative stress - A concise review. *Saudi Pharm J*. **24**(5): 547-553.
- Association of Vermont Recyclers. (1996). School solid waste reduction guide. www.vtrecyclers.org/WASTEKIT/definitions.htm
- Astrup A., Breum L et Toubro S. (1995). Pharmacological and clinical studies of ephedrine and other thermogenic agonists. *Obes Res*, **3**(S4): 537S – 540S.
- Atoui A.K., Mansouri A., Boskou G et Kefalas P. (2005). Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem*, **89**(1): 27–36.
- Attah A.F., Moody J O., Sonibare M.A., Salahdeen H.H., Akindele O.O., Nnamani P.O, Diyaolu O.A et Raji Y.(2019). Aqueous extract of *Moringa oleifera* leaf used in Nigerian ethnomedicine alters conception and some pregnancy outcomes in Wistar rat. *South African Journal of Botany*, **129** : 255-262.
- Attard E et Vella K. (2009). Effects of ephedrine and *Ephedra fragilis* crude extracts on human peripheral lymphocytes. *Pharmacogn. Res*, **1**(2): 38–42.
- Avula B., Wang Y.H., Pawar R.S., Shukla Y.J., Schaneberg B et Khan I.A. (2006). Determination of the appetite suppressant P57 in *Hoodia gordonii* plant extracts and dietary supplements by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry (LC-MSD-TOF) and LC-UV methods. *Journal of AOAC International*, **89**(3): 606–611.
- Baddack-Werncke U., Busch-Dienstfertg M., González-Rodríguez S., Maddila S. C., Grobe J., Lipp M., Stein C et Müller G. (2017). Cytotoxic T cells modulate inflammation and endogenous opioid analgesia in chronic arthritis. *J. Neuroinflammation*, **14**(1): 1-11.
- Badiaga M. (2011). Étude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* (Smith). Une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Thèse de Doctorat Chimie organique. Université de Bamako. P137.

- Bagnati M., Perugini C., Cau C., Bordone R., Albano E et Bellomo G. (1999). When and why a water-soluble antioxidant becomes pro-oxidant during copperinduced low-density lipoprotein oxidation: a study using uric acid. *Biochem. J*, **340**(1): 143-152.
- Ballero M., Foddìs C., Sanna C., Scartezzini P., Poli F., Petitto V., Serafini M., Stanzione A., Bianco A., Serilli A. M., Spina L., Longoni R et Kasture S. (2010). Pharmacological activities on *Ephedra nebrodensis* Tineo. *Nat Prod Res*, **24**(12): 1115-1124.
- Bandeira S. de M., Guedes G. da S., Fonseca L.J.S. da, Pires A.S., Gelain D.P., Moreira J.C.F., Rabelo L.A., Vasconcelos S.M.L et Goulart M.O.F. (2012). Characterization of blood oxidative stress in type 2 diabetes mellitus patients: increase in lipid peroxidation and SOD activity. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012: 13.
- Baranano D.E., Rao M., Ferris C.D et Snyder S.H. (2002). Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc. Natl. Acad. Sci*, **99**(25): 16093-16098
- Barros L., Dueñas M., Ferreira I.C.F.R., Carvalho M.A et Santos- Buelga C. (2011). Use of HPLC–DAD–ESI/MS to profile phenolic compounds in edible wild greens from Portugal. *Food Chem*, **127**(1): 169–173.
- Barros L., Alves C.T., Duenas M., Silva S., Oliveira R., Carvalho A.M., Henriques M., Santos-Buelga C., Ferreira I.C.F.R. (2013). Characterization of phenolic compounds in wild medicinal flowers from portugal by HPLC–DAD–ESI/MS and evaluation of antifungal properties. *Ind. Crops Prod*, **44**: 104–110.
- Basli A., Chibane M., Madani K et Oukil N. (2012). Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie : *Origanum glandulosum* Desf. *Phytothérapie*, **10**(1): 2–9.
- Beal M.F. (2002). Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic. Biol. Med*, **32**(9): 797-803.
- Becker D.E. (2013). Basic and clinical pharmacology of glucocorticosteroids. *Anesthesia Progress*, **60**(1): 25-32.
- Begas E., Tsioutsouliti A., Kouvaras E., Haroutounian S.A., Kasiotis K.M., Kouretas D et Asprodini, E. (2017). Effects of peppermint tea consumption on the activities of CYP1A2, CYP2A6, xanthine oxidase, n-acetyltransferase-2 and UDP-glucuronosyltransferases-1A1/1A6 in healthy volunteers. *Food Chem. Toxicol*, **100**: 80–89.
- Bellakhdar J. (1997). La pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. *Revue d'histoire de la Pharmacie*, **320**: 465-466.
- Ben Lamine J., Boujbiha M.A., Dahane S., Cherifa A.B., Khlifi A., Chahdoura H., Yakoubi M.T., Ferchichi S., El Ayeb N et Achour L. (2019). α -Amylase and α -glucosidase inhibitor effects and pancreatic response to diabetes mellitus on Wistar rats of *Ephedra alata* areal part decoction with immunohistochemical analyses. *Environ Sci Pollut Res Int*, **26**(10): 9739-9754.
- Bender A., Krishnan K.J., Morris C.M., Taylor G.A., Reeve A.K., Perry R.H., Jaros E., Hersheson J.S., Betts J., Klopstock T., Taylor R.W et Turnbull D.M. (2006). High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat. Genet*, **38**(5): 515-517.
- Bennick A. (2002). Interaction des polyphénols végétaux avec les protéines salivaires. *Crit Rev Oral Biol Med*, **13**(2):184-96.
- Berliner J.A., Navab M., Fogelman A.M., Frank J.S., Demer L.L., Edwards P.A., Watson A.D et Lusis A.J. (1995). Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation*, **91**(9): 2488-2496.
- Berthélémy S. (2015) Le bilan rénal. *Actualités pharmaceutiques*, **54**(549): 55-58.
- Bhardwaj P., Naryal A., Thakur M.S., Aggarwal N.K., Saxena S., Chaurasia O.P et Kumar R. (2020). Comparative antioxidant, antibacterial, and GC-MS analysis of methanol extract's fractions and isolation of luteolin from leaves of trans-Himalayan *Codonopsis clematidea*. *Ind. Crops Prod*, **144**: 112046.

- Bhattacharya A., Sood P., Citovsky V. (2010). The roles of plant phenolics in defence and communication during Agrobacterium and Rhizobium infection. *Mol. Plant Pathol*, **11**(5): 705–719.
- Birben E., Sahiner U M., Sackesen C., Erzurum S et Kalayci O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, **5**(1): 9-19.
- Bischoff K., Mukai M et Ramaiah S. K. (2018). Liver Toxicity. *In : Veterinary Toxicology. Academic Press*, 239–257.
- Blanck H.M., Khan L.K et Serdula M.K. (2001). Use of nonprescription weight loss products: results from a multistate survey. *Jama*, **286**(8): 930 – 935.
- Blois M.S., (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, **181**(4617): 1199–1200.
- Bony, E. (2010). Composition chimique et propriétés anti-inflammatoires de l'huile de pulpe d'awara (*Astrocaryum vulgare* M.) (Doctoral dissertation, UM2).
- Bouaziz A., Djidel S., Bentaher A et Khennouf S. (2020). Polyphenolic content, Antioxidant and Anti-inflammatory activities of Melon (*Cucumis Melo* L. var. *inodorus*) Seeds. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, **10**(2-S): 22-26.
- Bouaziz A., Khennouf S., Abu zarga M., Abdalla S., Baghiani A., Charef N. (2015). Phytochemical analysis, hypotensive effect and antioxidant properties of *Myrtus communis* L. growing in Algeria. *Asian Pac J Trop Biomed*, **5**(1): 19-28.
- Bouden I, Aimene W, Elder R et Arrar L, (2017). *In vitro* and *in vivo* anti-arthritic and antiinflammatory activity of *Matricaria pubescens*. *Advances in Environmental Biology*, **11**(11): 11-20.
- Boudjelal A., Henchiri, C., Sari M., Sarri D., Hendel N., Benkhaled A et Ruberto G. (2013). Herbalists and wild medicinal plants in M'Sila (North Algeria): An ethnopharmacology survey. *J. Ethnopharmacol*, **148**(2): 395–402.
- Boukeloua A. (2009). Caractérisation botanique et clinique et évaluation pharmactoxicologique d'une préparation topique à base d'huile de *Pistacia lentisca* L(Anacardiaceae).Thèse de magister Biologie. Université Mentouri Constantine. P73
- Bourbon A., Vionnet M., Leprince P., Vaissier E., Copeland J., McDonagh P., Debre P et Gandjbakhch I. (2004). The effect of methylprednisolone treatment on the cardiopulmonary bypassinduced systemic inflammatory response. *European journal of cardio-thoracic surgery*, **26**(5): 932-938.
- Boyd A., Bleakley C., Gill C., McDonough S., Hurley DA., Bell P., et al. (2013). Médicaments à base de plantes ou préparations pour la douleur neuropathique et la fibromyalgie. *Cochrane Database Syst Rev*.
- Bravo L., Goya L et Lecumberri E. (2007). LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. *Food Research International*, **40**(3):393-405.
- Brigelius-Flohé R. et Maiorino M. (2013). Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta (BBA)-General Subjects*, **1830**(5): 3289-3303.
- Brown G.C et Borutaite V. (2004). Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols. *Biochim Biophys Acta (BBA)-General Subjects*, **1658**(1-2): 44-49.
- Brown G.C et Borutaite V. (2012). There is no evidence that mitochondria are the main source of reactive oxygen species in mammalian cells. *Mitochondrion*, **12**(1): 1-4.
- Brownlee M. (2005). The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*, **54**(6): 1615-1625.
- Bulmer A.C., Ried K., Blanchfield J.T et Wagner K.H. (2008). The anti-mutagenic properties of bile pigments. *Mutat. Res*, **658**(1-2): 28-41.
- Burke K.E et Wei H. (2009). Synergistic damage by UVA radiation and pollutants. *Toxicology and Industrial Health*, **25**(4-5): 219-224.

- Burns J., Yokota T., Ashihara H., Lean M.E et Crozier A. (2002). Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J Agric Food Chem*, **50**(11): 3337 - 3340.
- Cao G., Sofic E et Prior R.L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic. Biol. Med*, **22**(5): 749 - 760.
- Cao X., Elvir-Lazo O.L., White P.F., Yumul R et Tanga J. (2016). An update on pain management for elderly patients undergoing ambulatory surgery. *Curr Opin Anaesthesiol*, **29**(6): 674-682.
- Capet C., Bentot C., Druesne L., Chassagne PH et Doucet J. (2001). Les effets indésirables des antiinflammatoires non stéroïdiens (AINS) chez le sujet âgé. *Revue Gériatr*, **26**(5): 379-384.
- Carek P.J et Dickerson L.M. (1999). Current concepts in the pharmacological management of obesity. *Drugs*, **57**(6): 883 – 904.
- Carip C. (2010). Biologie appliquée à la santé. 2ème édition, collection BTS économie sociale et familiale. *Lavoisier*, paris, France. 313-315.
- Caveney S., Charlet D.A., Freitag H., Maier-Stolte M et Starratt A.N. (2001). New observations on the secondary chemistry of world Ephedra (Ephedraceae). *Am J Bot*, **88**: 1199-1208.
- Ceker S., Agar G., Alpsyoy L., Nardemir G., Kizil H.E et Mete E. (2013). Protective Role of *Mentha longifolia* L. ssp. longifolia against Aflatoxin B. *J. Essent. Oil Bear. Plants*, **16**(5): 600–607.
- Chan K.L. (2003). Role of nitric oxide in ischemia and reperfusion injury. *Curr Med Chem*, **1**(1): 1-13.
- Chebouat E., Dadamoussa B., Gharabli S., Gherraf N., Allaoui M., Cheriti A., Lahham A et Zellagui, A. (2014). Assessment of antimicrobial activity of flavonoids extract from *Ephedra alata*. *Der Pharmacia Lettre*, **6**(3): 27–30.
- Chopra R.N., Nayar S.L et Chopra I.C. (1986). Glossary of Indian Medicinal Plants, New Delhi, India (Including the Supplement). Council of Scientific and Industrial Research.
- Chou R., Turner J. A., Devine E.B., Hansen R.N., Sullivan S.D., Blazina I et Deyo R.A. (2015). The Effectiveness and Risks of Long-Term Opioid Therapy for Chronic Pain: A Systematic Review for a National Institutes of Health Pathways to Prevention Workshop. *Annals of Internal Medicine*, **162**(4): 276-286.
- Chou S.T et Tseng S.T. (2017). Oxidative stress markers in type 2 diabetes patients with diabetic nephropathy. *Clin Exp Nephrol*, **21**(2): 283-292.
- Chu T.Y., Chang C.H., Liao Y.C et Chen Y.C. (2001). Microwave-accelerated derivatization processes for the determination of phenolic acids by gas chromatography–mass spectrometry. *Talanta*, **54**(6): 1163-1171.
- Chua, L.S. (2014). Review on Liver Inflammation and Antiinflammatory Activity of *Andrographis paniculata* for Hepatoprotection. *Phytotherapy Research*, **28**(11): 1589–1598.
- Chumbalov T.K., Chekmeneva L.N et Polyakov V.V. (1977). Phenolic acids of *Ephedra equisetina*. *Chem Nat Compd*, **13**(2): 238-239.
- Claverie I et Hedde H. (2008). Pharmacologie générale, mécanisme fondamentaux. 2ème Edition. *Porphy*. P 48-61.
- Corder G., Doolen S., Donahue R.R., Winter M.K., Jutras B.L., He Y., Hu X., Wieskopf J.S., Mogil J. S., Storm D. RWang., Z.J., McCarson K.E et Taylor B.K. (2013). Constitutive μ -opioid receptor activity leads to long-term endogenous analgesia and dependence. *Science*, **341**(6152): 1394–1399.
- Cottiglia F., Bonsignore L., Casu L., Deidda D., Pompei R., Casu M., Floris C. (2005). Phenolic constituents from *Ephedra nebrodensis*. *Nat Prod Res*, **19**(2): 117- 123.
- Coutinho A.E et Chapman K.E. (2011). The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **335**(1): 2-13.
- da Silva A.R., Moreira L.D.R., Brum E.D.S., de Freitas M.L., Boligon A.A., Athayde M.L., Roman S.S., Mazzanti C.M., Brandão, R. (2014). Biochemical and hematological effects of acute and sub-acute administration to ethyl acetate fraction from the stem bark *Scutia buxifolia* Reissek in mice. *J. Ethnopharmacol*, **153**(5): 908–916.

- Dacosta Y. (2003). Les phytonutriments bioactifs. *Yves Dacosta*, Paris. p 317.
- Dahl J.B., Mathiesen O et Moiniche S. (2004). “Protective premedication”: an option with gabapentin and related drugs? A review of gabapentin and pregabalin in the treatment of post-operative pain. *Acta Anaesthesiol Scand*, **48**(9): 1130–1136.
- Dahlbäck B. (2008). Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders. *Blood*, **112**(1): 19-27.
- Dalfó E., Portero-Otín M., Ayala V., Martínez A., Pamplona R et Ferrer I. (2005). Evidence of oxidative stress in the neocortex in incidental lewy body disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*, **64**(9): 816-830.
- Danciu C., Muntean D., Alexa E., Farcas C., Oprean C., Zupko I., Bor A., Minda D., Proks M.; Buda, V., Hancianu M., Cioanca O., Soica C., Popescu S et Dehelean C.A. (2019). Phytochemical Characterization and Evaluation of the Antimicrobial, Antiproliferative and Pro-Apoptotic Potential of *Ephedra alata* Decne. Hydroalcoholic Extract against the MCF-7 Breast Cancer Cell Line. *Molecules*, **24**(1): 13.
- Danielson M., Reinsfelt B., Westerlind A., Zetterberg H., Blennow K et Ricksten SE. (2018). Effects of methylprednisolone on blood-brain barrier and cerebral inflammation in cardiac surgery-a randomized trial. *Journal of Neuroinflammation*, **15**(1): 283.
- Danin A. (2018). Flora of Israel on line. <http://flora.huji.ac.il/browse.asp>. Accessed (Dec. 10, 2018).
- Debjit B., Pawan D., Margret C et Kumar, K.P.S. (2009). Herbal drug toxicity and safety evaluation of traditional medicines. *Arch. Appl. Sci. Res*, **1**(2): 32–56.
- Decker E.A et Welch B. (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *J Agric Food Chem*, **38**(3): 674–677.
- Decock C. (2018). le foie et la phytothérapie. Thèse de doctorat Pharmacie. Université de Lille. P130.
- Dehkordi N.V., Kachouie M.A., Pirbalouti A.G., Malekpoor F et Rabei M. (2015). Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of the extract of *Ephedra procera* fisch. et meyer. *Acta Pol Pharm*, **72**: 341-345.
- Dehkordy E.A., Tamadon M.R., Nasri H., Baradaran A., Nasri P et Beigrezaei S. (2017). Review of Possible Mechanisms of Analgesic Effect of Herbs and Herbal Active Ingredient. *J Young Pharm*, **9**(3): 303-306.
- Dejean C., Richard D. (2013). Mécanismes d’action des glucocorticoïdes. *La Revue de Medecine Interne*, **34**(5): 265-268.
- Delaporte R.H., Sarragiotto M.H., Takemura O.S., Sanchez G.M., Filho B.P.D et Nakamura C.V. (2004). Evaluation of the antioedematogenic, free radical scavenging and antimicrobial activities of aerial parts of *Tillandsia streptocarpa* Baker – Bromeliaceae. *J Ethnopharmacol*, **95**(2-3): 229–233.
- Dhingra A.K., Chopra B et Bonthagarala B. (2018). Natural Anti-Inflammatory Agents: Recent Progress and Future Perspectives. *Ann Pharmacol Pharm*, **3**(5): 1158.
- Di Meo S., Reed T.T., Venditti P et Victor V.M. (2016). Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2016**, 1-44.
- Diaz A.M., Abad M.J., Fernández L., Recuero C., Villaescusa L., Silvan A.M et Bermejo P. (2000). *In vitro* anti-inflammatory activity of iridoids and triterpenoid compounds isolated from *Phillyrea latifolia* L. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, **23**(11) :1307–1313.
- Dib I., Angenot, L., Mihamou A., Ziyat A., Tits M. (2017). *Artemisia campestris* L.: Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological review. *J. Herb. Med*, **7**: 1–10.
- Diesen D.L et Kuo P.C. (2011). Nitric oxide and redox regulation in the liver: part II. Redox biology in pathologic hepatocytes and implications for intervention, *J. Surg. Res*, **167**(1): 96-112.
- Diesen D.L et Kuo P.C. (2010). Nitric oxide and redox regulation in the liver: part I. General considerations and redox biology in hepatitis, *J. Surg. Res*, **162**(1): 95-109.

- Dirks J., Fredensborg B.B., Christensen D., Fomsgaard J.S., Flyger H et Dahl J.B. (2002). A randomized study of the effects of single-dose gabapentin versus placebo on postoperative pain and morphine consumption after mastectomy. *Anesthesiology*, **97**(3): 560–564.
- Dob T., Dahmane D et Chelghoum C. (2006). Essential Oil Composition of *Juniperus Oxycedrus* Growing in Algeria. *Pharm. Biol*, **44**(1): 1-6.
- Dosari AS., Amin Norouzi A., Moghadam MT et Satarzadeh N. (2016). Antimicrobial activity of *Ephedra pachyclada* methanol extract on some enteric gram negative bacteria which causes nosocomial infections by agar dilution method. *Zahedan J Res Med Sci*, **18**(1): 1-4.
- Droge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiol. Rev*, **82**(1): 47-95
- Dröse S et Brandt U. (2012). Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. In *Mitochondrial oxidative phosphorylation* (pp. 145-169). Springer, New York, NY.
- Duan W.L et Liang X.M. (2011). Technical Guidelines Assembly of Veterinary Medicine Research. Chemical Industry Press, Beijing.
- Duh P.D et Yen G.C. (1997). Antioxidative activity of three herbal water extracts. *Food Chem*, **60**(4): 639–645.
- Dulloo A.G. (1993). Ephedrine, xanthines and prostaglandin-inhibitors: actions and interactions in the stimulation of thermogenesis. *Int J Obes Relat Metab Disord*, **17**: S35 – S40.
- Dussol B. (2011). Méthodes d’exploration de la fonction rénale : intérêt et limites des formules permettant d’estimer la fonction rénale. *Immuno-analyse et biologie spécialisée*, **26**(1): 6-12.
- Dworski R., Fitzgerald G.A., Oates J.A et Sheller J.R. (1994). Effect of oral prednisone on airway inflammatory mediators in atopic asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **149**(4): 953-959.
- Eaton D. L et Gilber, S.G. (2008). Principles of toxicology. *Casarett & Doull’s toxicology: The basic science of poisons*, 11-43.
- Eggersdorfer M and Wyss A. (2018). Carotenoids in human nutrition and health. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **652**: 18-26.
- Ellman G.L., Courtney K.D., Andres Jr.V et Featherston R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol*, **7**(2): 88–95.
- Ercan H., Birben E., Dizdar E.A., Keskin O., Karaaslan C., Soyer O.U., Dut R., Sackesen C., Besler T et Kalayc O. (2006). Oxidative stress and genetic and epidemiologic determinants of oxidant injury in childhood asthma, *J. Allergy Clin. Immunol*, **118**(5): 1097-1104.
- Erdogan B., Is M., Aker F.V., Emon S.T., Engin T., Akar E.A., Sayman E et Somay H. (2019). Preventative effect of diclofenac sodium and/or diltiazem in rats with epidural fibrosis. *Bratislavske Lekarske Listy*, **120**(11): 813-818.
- Evans J.L., Maddux B.A et Goldfine I.D. (2005). The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. *Antioxid. Redox Signal*, **7**(7-8): 1040-1052.
- Evans P et Halliwill B. (2001). Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *British Journal Nutrition*, **85**(S2): 67-74.
- Evans G.O. (2009). Animal clinical chemistry: a practical handbook for toxicologists and biomedical researchers. CRC Press.
- Ezeja M.I., Anaga A.O et Asuzu I.U. (2014). Acute and sub-chronic toxicity profile of methanol leaf extract of *Gouania longipetala* in rats. *Journal of Ethnopharmacol*, **151**(3):1155-1164.
- Fabricant D.S et Farnsworth N.R. (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ. Health Perspect*, **109**(suppl 1): 69–75.
- Farid, N., Inbal, D., Nakhoul, N., Evgeny, F., Miller-Lotan, R., Levy, A.P et Rabea, A. (2013). Vitamin E and diabetic nephropathy in mice models and humans. *World J Nephrol*, **2**(4): 111-124.
- Farnsworth N.R. (Ed). (1995) NAPRALERT database. Chicago: University of Illinois at Chicago.

- Fearon I.M et Faux S.P. (2009). Oxidative stress and cardiovascular disease: novel tools give (free) radical insight, *J. Mol. Cell. Cardiol*, **47**(3): 372-381.
- Feng Y et Wang X. (2012). Antioxidant therapies for Alzheimer's disease. *Oxid. Med. Cell. Longev*, **2012** :17.
- Ferreira D et Li X. C. (2000). Oligomeric proanthocyanidins: Naturally occurring O-heterocycles. *Natural Products Report*, **17**(2): 193-212.
- Fiedor J et Burda K. (2014). Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients*, **6**(2): 466-488.
- Fraga C.G., Galleano M., Verstraeten S.V et Oteiza I. (2010). Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol Aspects Med*, **31**(6): 435-445.
- Franzotti E., Santos C., Rodrigues H., Mourao R., Andrade M et Antonioli A. (2000). Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Sida cordifolia* L. (Malva-branca). *J Ethnopharmacol*, **72**(1): 273-277.
- Fujiki H., Sueoka E., Watanabe T et Suganuma M. (2015). Primary cancer prevention by green tea, and tertiary cancer prevention by the combination of green tea catechins and anticancer compounds. *J Cancer Prev*, **20**(1): 1.
- Fukai T et Ushio-Fukai M. (2011). Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal*, **15**(6): 1583-1606.
- Gandhi S et Abramov A.Y. (2012). Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxid. Med. Cell. Longev*, **2012**: 11.
- Gao R., Yuan Z., Zhao Z. et Gao X. (1998). Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dimutase enzyme activity. *Bioelectrochemistry and bioenergetics*, **45**(1): 41-45.
- Garg G et Adams J.D. (2012). Treatment of neuropathic pain with plant medicines. *Chin J Integr Med*, **18**(8): 565-570.
- Gaston E. (2016). Les polyphénols du vin rouge : des propriétés pour prévenir les cancers ?. Thèse de Doctorat Pharmacie. Université de Bordeaux. P 160
- Georgé S., Brat P., Alter P., Amiot J.M. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of agrucular and food chimestry*, **53**(5): 1370-1373.
- Gharzouli K., Khenouf S., Amira S et Gharzouli A. (1999). Effects of aqueous extracts from *Quercus ilex* L. root bark, *Punica granatum* L. fruit peel and *Artemisia herba-alba* Asso leaves on ethanol-induced gastric damage in rats. *Phytotherapy Research*, **13**(1): 42-45.
- Ghasemi M., Azarnia M., Jamali M., Mirabolghasemi G., Nazarian S., Naghizadeh M. M., Rajabi M et Tahamtani Y. (2014). Protective effects of Ephedra pachyclada extract on mouse models of carbon tetrachloride- induced chronic and acute liver failure. *Tissue Cell*, **46**(1): 78-85.
- Ghasemzadeh A et Ghasemzadeh N. (2011). Flavonoids and phenolic acids: role and biochemical activity in plants and human. *J. Med. Plant Res*, **5**(31): 6697-6703.
- Ghedadba N., Hambaba L., Ayachi M.C., Aberkane H., Bousselfela S.M et OueldMoukhtar. (2015). Polyphénols totaux, activités antioxydant et antimicrobienne des feuilles de Marrubiumdeserti de Noé. *Phytothérapie*, **13**(2): 118 -129.
- Ghezzi P., Bonetto V et Fratelli M. (2005). Thiol-disulfide balance: from the concept of oxidative stress to that of redox regulation. *Antioxid. Redox Signal*, **7**(7-8): 964-972.
- Gidaro M.C., Alcaro F., Carradori S., Costa G., Vullo D., Supuran C.T et Alcaro S. (2015). Eriocitrin and apigenin as new carbonic anhydrase VA inhibitors, from a virtual screening of Calabrian natural products. *Planta. Med*, **81**(06): 533-540.
- Gill N.D., Shield A., Blazeovich A.J., Zhou S et Weatherby R.P. (2000). Muscular and cardiorespiratory effects of pseudoephedrine in human athletes. *Br J Clin Pharmacol*, **50**(3): 205-213.
- Glennon R.A et Young R. (2000). (+) Amphetamine-stimulus generalization to an herbal ephedrine product. *Pharmacol Biochem Behav*, **65**(4): 655-658.

- Godic A., Poljsak B., Adamic M et Dahmane R. (2014). The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. *Oxid. Med. Cell. Longev*, **2014** :6.
- Goli A.H., Barzegar M et Sahari M.A. (2004). Antioxidant activity, total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chem*, **92**(3): 521–525.
- Gongora M.C., Lob H.E., Landmesser U., Guzik T.J., Martin W.D., Ozumi K., Wall S.M., Wilson D.S., Murthy N., Gravanis M., Fukai T et Harrison D.G. (2008). Loss of extracellular superoxide dismutase leads to acute lung damage in the presence of ambient air: a potential mechanism underlying adult respiratory distress syndrome. *Am. J. Pathol*, **173**(4): 915-926.
- Goodman L.S et Gilman A. (1993). Goodman and Gilman's pharmacological basis of therapeutics. 8th edition. New York: MacMillan. 213–214.
- Görlach A., Bertram K., Hudecova S et Krizanova O. (2016). Calcium and ROS: a mutual interplay. *Redox Biol*, **6**: 260-271.
- Gowda S., Desai P.B., Kulkarni S.S., Hull V.V., Math A.A et Vernekar S.N. (2010). Markers of renal function tests. *N Am J Med Sci*, **2**(4):170.
- Grandin M. (2013). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens, utilisation et conseils dans la pratique officinale quotidienne. Document étayé par une analyse d'ordonnances d'une pharmacie rurale. Thèse de Doctorat Pharmacie, Université d'Angers. P116.
- Groves R.A., Hagel J.M., Zhang Y., Kilpatrick K., Levy A., Marsolais F., Lewinsohn E., Sensen C.W et Facchini P.J. (2015). Transcriptome profiling of Khat (*Catha edulis*) and *Ephedra sinica* reveals gene candidates potentially involved in amphetamine-type alkaloid biosynthesis. *PLoS One*, **10**(3): e0119701.
- Gülçin I. (2010). Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **11**(1): 210-218.
- Gupta S.K, Ghosal M, Biswas R, Saha B.K, Prasad Das A et Mandal P. (2014). Evaluation of *in vitro* antioxidant activity of methanolic extracts of some ferns from Mawsynram of Meghalaya, India. *Int J Curr Sci*, **12**: E87-E97.
- Gursoy N., Tepe B et Akpulat A.H. (2012). Chemical Composition and Antioxidant Activity of the Essential Oils of *Salvia palaestina* (Benth) and *S. ceratophylla* (L). *Journal Records of Natural Product*, **6**(3): 278-287.
- Gutteridge J.M.C. (1994). Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem. Biol. Interact*, **91**(2-3): 133-140.
- Guyton A.C et Hall J.E. (2006). Hemostasis and Blood Coagulation in Textbook of Medical Physiology, 11th Edition, Elsevier Inc, **1**: 419- 429.
- Gyamfi M.A et Aniya Y. (2002). Antioxidant properties of Thonningianin A, isolated from the African medicinal herb, *Thonningia sanguinea*. *Biochem Pharmacol*, **63**(9): 1725-1737.
- Hachi M., Benkhiguel O., Hachi T., El Bouhaddioui M., Bouabadi, I et Rochdi, A. (2016). Contribution to the ethnobotanical study of antidiabetic medicinal plants of the Central Middle Atlas region (Morocco). *Lazaroa*, **37**:135-144.
- Hadjadj K., Benaissa M., Mahammed M., Ouragh A et RAHMOUNE Abdelkarim. (2019). IMPORTANCE DES PLANTES MEDICINALES POUR LA POPULATION RURALE DU PARC NATIONAL DE DJEBEL AISSA (SUD OUEST ALGERIEN). *Lejeunia, Revue de Botanique*, N° 199.
- Haioun A et Zohra H.F. (2015). Activité antioxydante et anti-inflammatoire de la plante médicinale Algérienne *Anethium graveolens* et leur effet cardioprotectrice contre la toxicité de la 152 Anethume Graveolens. Mémoire de Master, Université des Frères Mentouri Constantine, Algérie. p 29-36.
- Hajhashemi V., Sajjadi S.E et Heshmati M. (2009). Anti-inflammatory and analgesic properties of *Heracleum persicum* essential oil and hydroalcoholic extract in animal models. *J Ethnopharmacol*, **124**(3): 475–480.

- Hajjaj G. (2017). Screening phytochimique, étude toxicologique et valorisation pharmacologique de *matricaria chamomilla* l. et de *l'ormenis mixta* l. (asteraceae). Thèse de Doctorat Sciences du Médicament. Université Mohammed V. P216.
- Halliwell B et Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA.
- Hansen S.S., Aasum E. and Hafstad A.D. (2018). The role of NADPH oxidases in diabetic cardiomyopathy. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, **1864**(5): 1908-1913.
- Harborne J.B et Williams C.A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, **55**(6): 481-504.
- Harisaranraj R., Suresh K et Saravanababu S. (2009). Evaluation of the Chemical Composition *Rauwolfia serpentina* and *Ephedra vulgaris*. *Advances in Biological Research*, **3**(5-6): 174-178.
- Hassan G.S., Hegazy G.H., Ibrahim N.M et Fahim S.H. (2019). New ibuprofen derivatives as H₂S and NO donors as safer anti-inflammatory agents. *Future Medicinal Chemistry*, **11**(23): 3029-3045.
- Hassanzadeh M., Dianat M., Torabizadeh P., Badavi M. (2014). Protective effect of hydroalcoholic extract of *ephedra major* on an experimental model of bile duct ligation in rats. *Int. J. LifeSc. Bt & Pharm. Res*, **3**(2): 45-50.
- Hedrich H.J et Bullock G.R. (2004). The Laboratory Mouse: Part of the Handbook of Experimental Animals by Contributor. *Academic Press*. pp. 556-559.
- 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. Sc*, **1**(8): 158-163.
- Heidari M.R., Zahedi M.J., Rezvani H. (2000). Analgesic effect of *lavandula officinalis* and histopathological studies in mice. *Scientific-Research Journal of Shahed University*, **8**: 23-30
- Hensley K., Butterfield D.A., Hall N., Cole P., Subramaniam R., Mark R., Mattson M.P., Markesbery W.R., Harris M.E., Aksenov M., Aksenova M., Wu J.F et Carney J.M. (1996). Reactive oxygen species as causal agents in the neurotoxicity of the Alzheimer's disease-associated amyloid beta peptide. *Ann. N. Y. Acad. Sci*, **786**(1): 120-134.
- Hillal G, Albert C et Vallée M. (2005). Mécanismes impliqués dans la néphrotoxicité, *Ann Biol Clin Québec*, **42**: 29-35.
- Hodgson E. (2004). A textbook of modern toxicology. 3th edition. USA : Wiley Interscience. 525-541.
- Holmström K.M et Finkel T. (2014). Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **15**(6): 411-421.
- Hooper D.C., Spitsin S., Kean R.B., Champion J.M., Dickson G.M., Chaudhry I et Koprowski H. (1998). Uric acid, a natural scavenger of peroxynitrite, in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, **95**(2): 675-680.
- Horn F., Lindenmeier G., Grillhosl C., Moc I., Berghold S., Schneider N et Munster B. (2005). *Biochimie humaine. Médecine-sciences*. Flammarion. 512.
- Hyuga S., Hyuga M., Oshima N., Maruyama T., Kamakura H., Yamashita T., Yoshimura M., Amakura Y., Hakamatsuka T et Odaguchi H. (2016). Ephedrine alkaloids-free Ephedra herb extract: a safer alternative to ephedra with comparable analgesic, anticancer, and anti influenza activities. *J Nat Med*, **70**(3): 571-583
- Ibragic S et Sofić E. (2015). Chemical composition of various Ephedra species. *Bosn J. Basic Med. Sci*, **15**(3): 21- 27.
- Ibrahima D. (2019). Potentiels anti-oxydants et anti-inflammatoires de sporophores de Lentinula edodes (Shiitake) sous différentes conditions de culture. Médecine humaine et pathologie. Thèse de Doctorat Sciences des Aliments et Nutrition. Université Montpellier. P45.
- Ikpi D et Nku C. (2008). Effect of ethanolic extract of *dennettia tripetala* fruit on haematological parameters in albino wistar rats. *Nigerian Journal of Physiological Sciences*, **23**(1-2).
- Jaganath I.B et Crozier A. (2010). Dietary flavonoids and phenolic compounds. C.G. Fraga, Plant phenolics and human health, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ. 1-49.

- James T., Mukinda P., Eagles F.K. (2010). Acute and sub-chronic oral toxicity profiles of the aqueous extract of *Polygala fruticosa* in female mice and rats. *Journal of Ethnopharmacol*, **128**(1): 236-240.
- Jaradat N., Hussen F et Anas Ali A. (2015). Preliminary Phytochemical Screening, Quantitative Estimation of Total Flavonoids, Total Phenols and Antioxidant Activity of *Ephedra alata Decne. J. Mater. Environ. Sci*, **6**(6): 1771-1778.
- Jeong S.Y., Kim D.R., Kim K.C., Nam D.U et Ahn Lee S.C. (2004). Effect of seed roasting conditions on the antioxidant activity of defatted sesame meal extracts. *Food Chem. Toxicol*, **69**(5): C377–C381.
- Jeong W.Y, Jin J.S, Cho Y.A, Lee J.H, Park S, Jeong S.W, Kim Y.H, Lim C.S, El-Aty A.A, Kim G.S et Lee S.J. (2011). Determination of polyphenols in three *Capsicum annuum* L. (bell pepper) varieties using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: their contribution to overall antioxidant and anticancer activity. *J. Sep. Sci*, **34**(21): 2967–2974.
- Jerbi A., Zehri S., Abdnnabi R., Gharsallah N., Kammoun M. (2016). Essential oil composition, free-radicalscavenging and antibacterial effect from stems of *Ephedra alata alenda* in Tunisia. *J. Essent. Oil Bear. Plants*, **19**(6): 1503–1509.
- Jia Q., Su W et Peng W. (2008). Anti diarrhoea and analgesic activities of the methanol extract and its fractions of *Jasminum amplexicaule* Buch-Ham (Oleaceae). *Journal of Ethnopharmacol*, **119**(2): 299-304.
- Joseph E.K., Reichling D.B et Levine J.D. (2010). Shared mechanisms for opioid tolerance and a transition to chronic pain. *J. Neurosci*, **30**(13): 4660–4666.
- Jung J.C., Lim E., Lee Y., Kang J.M., Kim H., Jang S., Oh S et Jung M. (2009). Synthesis of novel trans-stilbene derivatives and evaluation of their potent antioxidant and neuroprotective effects. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **44**(8): 3166-3174.
- Kandikattu K., Bharath Rathna Kumar P., Venu Priya R., Sunil Kumar K., Ranjith Singh et B.Rathore. (2013). Evaluation of anti-inflammatory activity of *canthium parviflorum* by *in-vitro* method. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology*, **1**: 729-730.
- Kang D.H., Nakagawa T., Feng L., Watanabe S., Han L., Mazzali M., Truong L., Harris R et Johnson R.J. (2002). A role for uric acid in the progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol*, **13**(12): 2888–2897.
- Kapil A., Sharma S. (1995). Effect of oleanolic acid on complement in adjuvant- and carrageenan-induced inflammation in rats. *Journal of Pharmacy & Pharmacology*, **47**(7): 585–587.
- Kapner D.A. (1997). “Adverse Effects of Botanical and Non-Botanical Ephedrine Products”, Harvard School of Public Health.
- Kasahara Y., Hikino H., Tsurufuji S., Watanabe M et Ohuchi, K. (1985). Antiinflammatory actions of ephedrine in acute inflammations¹. *Planta Med*, **51**(104): 325-331.
- Kasahara Y., Shinomiya N., Konno C et Hikino H. (1983). Structure of mahuannin C, a hypotensive principle of *Ephedra* roots. *Heterocycles (Sendai)*, **20**(9): 1741-1744.
- Kasapović J., Pejić S., Stojiljković V., Todorović A., Radošević-Jelić L., Saičić, Z. S et Pajović, S. B. (2010). Antioxidant status and lipid peroxidation in the blood of breast cancer patients of different ages after chemotherapy with 5-fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide. *Clin. Biochem*, **43**(16-17): 1287–1293.
- Kassim M., Achoui M., Mansor M et Yusoff, K. M. (2010). The inhibitory effects of Gelam honey and its extracts on nitric oxide and prostaglandin E2 in inflammatory tissues. *Fitoterapia*, **81**(8): 1196–1201.
- Katalinić M., G. Rusak J., Domaćinović Barović G., Sinko D., Jelić R., Antolović et Z. Kovarik. (2010). Structural aspects of flavonoids as inhibitors of human butyrylcholinesterase. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **45**(1): 186–192.
- Katsinelos P., Lazaraki G., Anastasiadis S., Chatzimavroudis G., Katsinelos T., Terzoudis S., Gatopoulou A., Doulberis M., Papaefthymiou A et Kountouras J. (2019). The impact of selective

- serotonin receptor inhibitors on post-endoscopic sphincterotomy bleeding, alone or with concurrent aspirin or nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Annals of Gastroenterology*, **32**(6): 614-619.
- Khaksarian M., Javan M., Sonboli A et Motamedi F. (2004). Inhibition of acute and chronic pain in male rats by aqueous extract of *Hypericum perforatum* L. *YAFTEH*, **5**:11-17
- Khalil M., Khalifeh H., Saad F., Serale N., Salis A., Damonte G., Lupidi G., Daher A et Vergani L. (2020). Protective effects of extracts from *Ephedra foeminea* Forssk fruits against oxidative injury in human endothelial cells. *Journal of Ethnopharmacol*, **260**: 112976.
- Khan A., Jan G., Khan A., Gul Jan F., Bahadur A et Danish M. (2017). *In vitro* antioxidant and antimicrobial activities of *Ephedra gerardiana* (root and stem) crude extract and fractions. *Evid.-Based Complement. Altern. Med*, **2017**: 6.
- Khan A.Q., Khan R., Qamar W., Lateef A., Ali F., Tahir M. , Rehman M.U et Sultana S. (2012). Caffeic acid attenuates 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA)-induced NF- κ B and COX-2 expression in mouse skin: Abrogation of oxidative stress, inflammatory responses and proinflammatory cytokine production. *Food Chem. Toxicol*, **50**(2):175–83.
- Khanbabaee K et Van Ree T. (2001). Tannins: classification and definition. *Natural Product Report*, **18**(6): 641-649.
- Kim T.H., Yang K.S., Hwang, E.Z et Park S.B. (1991). Effect of *Ephedra herba* on the immune response in mice. *Korean Journal of Pharmacognosy*, **22**(3): 183–191.
- Klatt P., Lamas S. (2000). Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur. J. Biochem*, **267**(16): 4928-4944.
- Kobaisy M., Tellez M. R., Khan I. A et Schaneberg B. T. (2005). Essential Oil Composition of Three Italian Species of *Ephedra*. *J. Essent. Oil Res*, **17**(5): 542-546.
- Kogiannou D.A., Kalogeropoulos N., Kefalas P., Polissiou, M.G et Kaliora A.C. (2013). Herbal infusions; their phenolic profile, antioxidant and anti-inflammatory effects in HT29 and PC3 cells. *Food Chem. Toxicol*, **61**:152–159.
- Koleva I.I., Van beek T.A., Linssen J.P.H., de Groot A et Evstatieva, L.N. (2002). Screening of plant extracts of antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *phytochem anal*, **13**(1): 8-17.
- Konno C. (1979). Ephedroxane, anti-inflammatory principle of *Ephedra* herbs. *Phytochemistry*, **18**: 697–698.
- Koster R., Anderson M et De Beer J. (1959). Acetic acid for analgesic screening. *Federal Proceeding*, **18**: 412–417.
- Krache I., Boussoulim N., Trabsa H., Ouhida S., Baghiani A et Arrar L, (2018). Antioxidant, Antihemolytic, Antihyperuricemic, Antiinflammatory Activity of Algerian Germander Methanolic Extract. *Annual Research & Review in Biology*, **23**: 1-14.
- Krizevski R., Bar E., Shalit O., Sitrit Y., Ben-Shabat S et Lewinsohn E. (2010). Composition and stereochemistry of ephedrine alkaloids accumulation in *Ephedra sinica* Stapf. *Phytochemistry*, **71**(9-8): 895-903.
- Kubab N., Hakawati I et Alajati-Kubab S. (2006). Guide des examens biologiques. 4e édition. Collection Les Fondamentaux. Rueil-Malmaison: Lamarre.
- Kumar P., Mishra S., Malik A et Satya S. (2011b). Insecticidal properties of *Mentha* species: A review. *Ind. Crops Prod*, **34**(1): 802–817.
- Kumar Sh. (2011a). Free Radicals and Antioxidants: Human and Food System. *Advances in Applied Science Research*, **2**(1): 129-135.
- Lameire N., Van Biesen W et Vanholder R. (2005). Acute renal failure. *The Lancet*, **365**(9475): 417–430.
- Lan M., Wan P., Wang Z.Y., Huang X.L. (2012). Analisis GC-MS Komponen Kimia dalam Minyak Biji Croton Tiglium. *Zhong Yao Cai journal*, **35**(7) :1105-8.
- Lapointe G. (2004). Notions de Toxicologie. 2nd edition. Commission de la santé et de la sécurité du travail (Québec, Canada). 16-20.

- Lauretti G.R., de Olivera R., Reis M.P., Juliao M.D.C et Pereira L.N. (1999). Study of three different doses of epidural neostigmine co-administered with lidocaine for postoperative analgesia. *Anesthesiology*, **90**(6): 1534–1538.
- Le Bars D., Gozariu M et Cadden S.W. (2001). Animal models of nociception. *Pharmacol Rev*, **53**(4): 597–652.
- Lecour S et Lamont KT. (2011). Natural polyphenols and cardioprotection. *Mini Rev Med Chem*, **11**(14): 1191-1199.
- Leduc-Pessah H., Weilinger N.L., Fan C.Y., Burma N.E., Thompson R.J et Trang T. (2017). Site-specific regulation of P2X7 receptor function in microglia gates morphine analgesic tolerance. *J. Neurosci*, **37**(42): 10154-10172.
- Lee J., Bae E.H., Ma S.K. et Kim S.W. (2016). Altered nitric oxide system in cardiovascular and renal diseases. *Chonnam Med J*, **52**(2): 81-90.
- Lee S.E., Lim C., Lim S., Lee B et Cho S. (2019). Effect of Ephedrae Herba methanol extract on high-fat diet-induced hyperlipidaemic mice. *Pharm. Bio*, **57**(1): 676-683.
- Lenaz G. (2012). Mitochondria and reactive oxygen species. Which role in physiology and pathology?. *Adv Exp Med Biol*, **942**: 93-136.
- Leriverend H., Annaix V et Faure S. (2016). La fonction rénale, une donnée essentielle. Actualités pharmaceutiques. *Elsevier Masson SAS*, n° **557**. 20- 22.
- Levey A.S., Coresh J., Greene T., Stevens L.A., Zhang Y.L., Hendriksens S., Kusek J.W et Lente F.V. (2006). Using standardized serum creatinine values in the modification of diet in renal disease study equation for estimating glomerular filtration rate. *Ann Intern Med*, **145**(4): 247-254.
- Li H.B., Cheng K.W., Wong C.C., Fan K.W., Chen F et Jiang Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chem*, **102**(3): 771-776.
- Li X., Luo Y., Wang L., Li Y., Shi Y., Cui Y et Xue M. (2010). Acute and subacute toxicity of ethanol extracts from *Salvia przewalskii* Maxim in rodents. *Journal of Ethnopharmacol*, **131**(1): 110–115.
- Lim J., Lee H., Ahn J., Kim J., Jang J., Park Y., Jeong B., Yang H., Shin S.S et Yoon, M. (2018). The polyherbal drug GGEx18 from *Laminaria japonica*, *Rheum palmatum*, and *Ephedra sinica* inhibits hepatic steatosis and fibroinflammation in high-fat diet-induced obese mice. *J Ethnopharmacol*, **225**: 31-41.
- Lin W.W et Karin M. (2007). A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *Journal of Clinical Investigation*, **117**(5):1175–1183.
- Liu G., Rajesh N., Wang X., Zhang M., Wu Q., Li S., Bo C et Shouzhuo Y. (2011). Identification of flavonoids in the stems and leaves of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Journal of Chromatography B*, **879**(13-14): 1023-1028.
- Liu L., Sun Y., Laura T., Liang X., Ye H et Zeng X. (2009). Determination of polyphenolic content and antioxidant activity of kudingcha made from *Ilex kudingcha* CJ Tseng. *Food Chem*, **112**(1): 35–41.
- Liu Y.G et Luo J.B. (2007). Effects of among compositions of Herba Ephedrae decoction on gene expression of 5-lipoxygenase activating protein, IL-4 and leukotriene C4 in asthmatic mice. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, **32**(3): 246– 249.
- Loomis T.A. et Hayes A.W. (1996). Loomis's essentials of toxicology. 4th ed., California, *Academic press*. 208- 245.
- López-Alarcón C et Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, **763**: 1–10.
- Losada-Barreiro S et Bravo-Díaz C. (2017). Free radicals and polyphenols: the redox chemistry of neurodegenerative diseases. *Eur J Med Chem*, **133**: 379-402.
- Lü J.M., Lin P.H., Yao Q et Chen C. (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med*, **14**(4): 840-860.

- Lu T.C., Ko Y.Z., Huang H.W., Hung Y.C., Lin Y.C et Peng W.H. (2007). Analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous extract from *Glycine tomentella* root in mice. *J Ethnopharmacol*, **113**(1):142–148.
- Luo W., Zhao M., Yang B., Ren J., Shen G et Rao J. (2011). Antioxidant and antiproliferative capacities of phenolics purified from *Phyllanthusemblica* L. fruit. *Food Chem*, **26**(1): 277-282.
- Lv M., Sun J., Wang M., Huang W., Fan H., Xu F et Zhang, Z. (2015). GC-MS based metabolomics study of stems and roots of *Ephedra sinica*. *J. Pharm. Biomed. Anal*, **114**: 49–52.
- Lyn Patrick N.D. (2006). Lead Toxicity Part II: The Role of Free Radical Damage and the Use of Antioxidants in the Pathology and Treatment of Lead Toxicity. *Alternative medicine review*, **11**(2): 114-127.
- Madamanchi N.R et Runge M.R. (2013). Redox signaling in cardiovascular health and disease. *Free Radic Biol Med*, **61**: 473-501.
- Maggi F., Lucarini D., Tirillini B., Vittori S., Sagratini G et Papa F. (2010). Essential oil composition of *Ephedra nebrodensis* Tineo ex Guss.subsp. *nebrodensis* from central Italy. *J. Essent. Oil Res*, **22**(4): 354–357.
- Maheshwari RA, Balaraman R, Sen AK et Seth AK. (2014). Effect of coenzyme Q10 alone and its combination with metformin on streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic nephropathy in rats. *Indian J Pharmacol*, **46**(6): 627- 632
- Maïga A., Diallo D., Fané S., Sanogo R., Paulsen BS et Cissé B. (2005). A survey of toxic plants on the market in the district of Bamako, Mali: traditional knowledge compared with a literature search of modern pharmacology and toxicology. *Journal of Ethnopharmacol*, **96**(1-2): 183-193.
- Male D., Roitt Y., Brostoff J et Roth D.B (2007). Mécanisme de l'immunité innée. In: Immunologie, Masson, Paris. 155.
- Manea A. (2010). NADPH oxidase-derived reactive oxygen species: involvement in vascular physiology and pathology. *Cell. Tissue Res*, **342**(3): 325-339.
- Manea A., Fortuno A et Martin-Ventura J.L. (2012). Oxidative stress in cardiovascular pathologies: genetics, cellular, and molecular mechanisms and future antioxidant therapies. *Oxid. Med. Cell. Longev*, **3**.
- Manga H.M., Brkic D., Marie D.E.P et Quetin-Leclercq J. (2004). *In vivo* anti-inflammatory activity of *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) Mull. Arg. (Euphorbiaceae). *J Ethnopharmacol*, **92**(2-3): 209-214.
- Marco G.J. (1968). A rapid method for evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc*, **45**(9): 594–598.
- Marieb N.E. (2008). Biologie humaine principes d'anatomie et de physiologie. 8^{ème} édition. Pearson Education.
- Markham K.R. (1982). Techniques of flavonoid identification. *Academic Press London*, **36**: 133.
- Maroon J.C., Bost J.W et Maroon A. (2010). Natural anti-inflammatory agents for pain relief. *Surgical Neurology International*, **1**: 80.
- Martin-Pelaez S., Covas M., Fito M., Kusar A et Pravst I. (2013). Health effects of olive oil polyphenols: recent advances and possibilities for the use of health claims. *Mol Nutr Food Res*, **57**(5): 760–771.
- Martins M., Barros L., Santos-Buelga C., Henriques M., Silva S et Ferreira I.C.F.R. (2014). Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of *Origanum vulgare* L.: different performances regarding bioactivity and phenolic compounds. *Food Chem*, **158**: 73-80.
- Maulik N., McFadden D., Otani H., Thirunavukkarasu M et Parinandi N.L. (2013). Antioxidants in longevity and medicine. *Oxid. Med. Cell. Longev*, **3**.
- May J.M. (2012). Vitamin C transport and its role in the central nervous system, *Subcell. Biochem*, **56**: 85-103.

- Maya D. (2019). Traitement de la douleur par les médicaments opioïdes : rôle du pharmacien dans des cas d'addiction et lors de sevrage. Thèse de doctorat Pharmacie. Université de Bordeaux.
- McCormack D et McFadden D. (2012). Pterostilbene and cancer: Current review. *Journal of Surgical Research*, **173**(2): e53-e61.
- McCuskey R. (2012). Anatomy of the liver. *Zakim and Boyer's Hepatology: a textbook of liver disease*, **6**: 3-19.
- McIntyre N et Rosaki S. (1987). Investigations biochimiques des affections hépatiques. *Pharmazie*, **12**(3): 294-309.
- Meagher E et Rader D.J. (2001). Antioxidant therapy and atherosclerosis: animal and human studies, *Trends Cardiovasc. Med*, **11**(3-4): 162-165.
- Mebirouk R. (2017). Recherche et évaluation des activités biologiques de trois extraits d'*Helix aspersa* (aqueux, hydro alcoolique et organique) : Activités anti-inflammatoire, anti tumorale et antiangiogénique. Thèse de Doctorat. Université des frères Mentouri Constantine. P172.
- Megdiche-Ksouri W., Trabelsi N., Mkadmini K., Bourgou S., Noumi A., Snoussi M., Barbria R., Tebourbi O et Ksouri R. (2015). *Artemisia campestris* phenolic compounds have antioxidant and antimicrobial activity. *Ind. Crops Prod*, **63**: 104–113.
- Mekky R.H., Abdel-Sattar E., Segura-Carretero A et Contreras, M.D.M. (2019). Phenolic compounds from sesame cake and antioxidant activity: A new insight for agri-food residues' significance for sustainable development. *Foods*, **8**(10): 432.
- Melillo A. (2007). Pathologie clinique du lapin. *J. Exot. Pet Med*, **16**: 135- 145.
- Mendelovich M., Shoshan M., Fridlender M., Mazuz M., Namder D., Nallathambi R., Selvaraj G., Kumari P., Ion A., Winger S., Nasser A., Samara M., Sharvit Y., Kapulnik Y., Dudai N et Koltai H. (2017). Effect of *Ephedra foeminea* active compounds on cell viability and actin structures in cancer cell lines. *J Med Plants Res*, **11**(43): 690-702.
- Mercan M.D. (2010). Le stress oxydatif. Unilabs A.R.L Lausanne. 53.
- Merghem M et Dahamna S (2020). *In-Vitro* Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of *Ruta montana* L. Extracts, *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, **10**(2): 69-75 .
- Middleton E., Kandaswami C et Theoharides T.C. (2000). The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacological Reviews*, **52**(4): 673-751.
- Mighri H., Akrouf A., Bennour N., Eljeni H., Zammouri T et Neffati M. (2019). LC/MS method development for the determination of the phenolic compounds of Tunisian *Ephedra alata* hydro-methanolic extract and its fractions and evaluation of their antioxidant activities. *South African Journal of Botany*, **124**: 102–110.
- Miladi G.H., Rashidipour A., Vafaei A.A et Taherian A.A. (2006). Opioid receptors role on antinociceptive effects of the aqueous extracts of *Melissa officinalis* in mice. *J Hormozgan Univ Med Sci*, **10**(1): 23-28
- Miller N.J., Sampson J., Candeias L.P., Bramley P.M et Rice-Evans C.A. (1996). Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett*, **384**(3): 240–242.
- Mironczuk-Chodakowska I., Witkowska A.M. et Zujko M.E. (2017). Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Advances in medical sciences*, **63**(1): 68-78.
- Mirshafiey A et Mohsenzadegan M. (2008). The role of reactive oxygen species in immunopathogenesis of rheumatoid arthritis, *Iran. J. Allergy Asthma Immunol*, **7**: 195-202.
- Mohamad N., Falah A., Fatima J., Hussein K., Akram H., Ali et C., Hassan, R. (2016). Antibacterial, antioxidant and antiproliferative activities of the hydroalcoholic extract of the lebanese plant: *Ephedra Campylopoda*. *Int. Res. J. Pharm*, **7**: 23–29.
- Mokhtari M., Shariati M et L Khodaparast. (2009). The antinociceptive effect of hydroalcoholic extract of leave *Mentha pulegium* in formalin test in male rat. *J Shahrekord Univ Med Sci*, **10**(4).

- Montezano A.C et Touyz R.M. (2012). Molecular mechanisms of hypertension and reactive oxygen species and antioxidants: a basic science update for the clinician. *Can. J. Cardiol*, **28**(3): 288-295.
- Moreno-Macias H et Romieu I. (2014). Effects of antioxidant supplements and nutrients on patients with asthma and allergies. *J. Allergy Clin. Immunol*, **133**(5): 1237-1244.
- Mouffouk C., Hambaba L., Haba H., Mouffouk S., Bensouici C., Hachemi M et Khadraoui H., (2018). Acute toxicity and *in vivo* anti-inflammatory effects and *in vitro* antioxidant and anti-arthritis potential of *Scabiosa Stellata*. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, **18**(4): 335–348.
- Mullen W., Yokota T., Lean E.J.M et Crozier A. (2003). Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC–MSⁿ. *phytochemistry*, **64**(2): 617-624.
- Muller H. G et Tobin G. (1980). Nutrition and Food Processing, Groom Helm Ltd., London, UK.
- Müller L., Gnoyke S., Popken A.M et Böhm V. (2010). Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT - Food Science and Technology*, **43**(6): 992-999.
- Munhall A.C et Johnson S.W. (2006). Dopamine-mediated actions of ephedrine in the rat Substantia nigra. *Brain Research*, **1069**(1): 96–103.
- Muraoka S et Miura T. (2003). Inhibition by uric acid of free radicals that damage biological molecules. *Pharmacol. Toxicol*, **93**(6): 284-289.
- Muzza M et Fugazzola L. (2017). Disorders of H₂O₂ generation. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, **31**(2): 225–240.
- Nam N.H., Lee C.W., Hong D.H., Kim H.M., Bae K.H et Ahn B.Z. (2003). Antiinvasive, antiangiogenic and antitumour activity of *Ephedra sinica* extract. *Phytother. Res*, **17**(1): 70–76.
- Nasri S., Ramazani M et Yasa N. (2009). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract of *Apium graveolens*. *J Shahrekord Univ Med Sci*, **10**: 25-31.
- Nasri S., Ramezanghorbani A et Kamalinejad M. (2011). Analgesic and anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract of *Stachys Lavandulifolia* Vahl s, aerial parts in male mice. *Armaghane danesh*, **16**(2): 161-171.
- Nawwar M.A.M., El-Sissi H.I et Barakat H.H. (1984). Flavonoid constituents of *Ephedra alata*. *Phytochemistry*, **23**(12): 2937-2939.
- Newman D.J et Price CP. (2005). Renal Function and Nitrogen Metabolites dans Hilal G, Albert C, Vallée M.. Mécanismes impliqués dans la néphrotoxicité, *Ann Biol, Clin Québec*, **42** (3) : 29.
- Nieto F.J., Iribarren C., Gross M.D., Comstock G.W et Cutler RG. (2000). Uric acid and serum antioxidant capacity: a reaction to atherosclerosis?. *Atherosclerosis*, **148**(1):131– 139.
- Nsimba R.Y, Kikuzaki H et Konishi Y, (2008). Antioxidant activity of various extracts and fractions of *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus* spp. Seeds. *Food Chem*, **106**(2): 760–766.
- Nur Alam M.D., Bristi N.J et Rafiquzzaman, M.D. (2013). Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm J*, **21**(2): 143-152.
- O'Dowd NA., McCauley G., Wilson JAN., Parnell TAK et Kavanaugh D. (1998). *In vitro* culture, micropropagation and the production of ephedrine and other alkaloids. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry, Bajaj YPS., Springer, Berlin. 41.
- Oh S.M., Kim H.R., Park Y.J., Lee S.Y et Chung K.H. (2011). Organic extracts of urban air pollution particulate Matter (pm_{2.5}) induced genotoxicity and oxidative stress in human lung bronchial epithelial cells (BEAS-2B cells). *Mutation research*, **723**(2): 142-151.
- Ohru T., Yasuda H., Yamaya M., Matsui T et Sasaki H. (2003). Transient relief of asthma symptoms during jaundice: a possible beneficial role of bilirubin. *Tohoku J. Exp. Med*, **199**(3): 193-196.
- Olorunnisola O.S., Bradley G et Afolayan A.J. (2012). Antioxidant activity of acetone and ethanolic leaves extracts of *Hippobromus pauciflorus* (L.f.) Radlk. *African Journal Biotechnology*, **11**(5): 1206-1213.
- Olthof M.R., Hollman P.C.H et Katan M. (2001). Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *Human Nutrition and Metabolism*, **131**(1): 66-71.

- Orejola J., Matsuo Y., Saito Y et Tanaka T. (2017). Characterization of proanthocyanidin oligomers of *Ephedra sinica*. *Molecules*, **22**(8):1308.
- Orliaguet G., Gall O et Benabess-Lambert F. (2013). Nouveautés concernant les anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens. *Le Praticien en Anesthésie Réanimation*, **17**(5):228—237.
- Orsomando E. (1969). Areale italiano di *Ephedra nebrodensis*. *Host. Mitt. ostalp.-din., pflanzensoz. Arbeitsgem*, **9**: 341- 348.
- Ossipov M. H., Dussor G. O et Porreca F. (2010). Central modulation of pain. *J. Clin. Invest*, **120**(11): 3779–3787.
- Oyaizu M. (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, **44**(6): 307–315.
- Ozenda P. (1958). Flore du Sahara. CNRS, ed., Paris, France.
- Ozenda P. (1991). Flore et végétation du Sahara. Centre National De La Recherche Scientifique, Paris. 3^{ème} Edition. 662.
- Ozer J., Ratner M., Shaw M., Bailey W et Schomaker S. (2008). The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology*, **245**(3): 194–205.
- Ozougwu J. (2007). Physiology of the liver. *International Journal of Research in Pharmacy and Biosciences*, **4**(8): 13-24.
- Parejo I., Viladomat F., Bastida J., Rosas-Romero A., Flerlage N., Burillo J et Codina C. (2002). Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *J. Agric. Food Chem*, **50**(23): 6882–6890.
- 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**(3): 1668–1678.
- Pascoe D. (1983). Toxicology. England, London, Edward Arnold limited. 1-60.
- Pawlowska A.M., Camangi F., Bader A et Braca A. (2009). Flavonoids of *Zizyphus jujuba* L. and *Zizyphus spina-christi* (L.)Willd (Rhamnaceae) fruits. *Food Chem*, **112**(4): 858–862.
- Peng W.J., Xin R.H., Luo Y.J., Liang G., Ren L.H., Liu Y., Wang G.B., Zheng J.F. (2016). Evaluation of the acute and subchronic toxicity of *Aster tataricus* L. F. *Afr. J. Tradit., Complementary Altern. Med*, **13**(6): 38–53.
- Pereira C.G., Barreira L., da Rosa Neng N., Nogueira J.M.F., Marques C., Santos T.F., Varela J et Custódio. (2017). Searching for new sources of innovative products for the food industry within halophyte aromatic plants: *in vitro* antioxidant activity and phenolic and mineral contents of infusions and decoctions of *Crithmum maritimum* L. *Food Chem. Toxicol*, **107**: 581–589.
- Pereira, I., Severino, P., Santos, A.C., Silva, A.M et Souto, E.B. (2018). Linalool bioactive properties and potential applicability in drug delivery systems. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **171**: 566–578.
- Persson M.F., Franzén S., Catrina S.B., Dallner G., Hansell P., Brismar K., Palm F. (2012). Coenzyme Q10 prevents GDP-sensitive mitochondrial uncoupling, glomerular hyperfiltration and proteinuria in kidneys from db/db mice as a model of type 2 diabetes. *Diabetologia*, **55** (5): 1535-1543.
- Persson T., Popescu B.O et Cedazo-Minguez A. (2014). Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail. *Oxid. Med. Cell. Longev*, **2014**: 11.
- Pfeifer G et Besarantinia A. (2012). UV wavelength dependent DNA damage and human nonmelanoma and melanoma. *Photochemistry photobiology science*, **11**(1): 90- 97.
- Pignatti S. (1997). In: S. Pignatti (Ed.) Flora d'Italia. Edagricole, Bologna, **1**: 87–88.
- Pinelo M., Rubilar M., Sineiro J et Nunez M.J. (2004). Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). *Food Chem*, **85**(2): 267–273.
- Pinto N.D.C.C., Machado D.C., da Silva J.M., Conegundes J.L.M., Gualberto A.C.M., Gameiro, J., Chedier L.M., Castañon M.C.M.N et Scio E. (2015). *Pereskia aculeata* Miller leaves present *in vivo* topical anti-inflammatory activity in models of acute and chronic dermatitis. *J Ethnopharmacol*, **173**: 330–337.

- Pirbalouti A.G., Azizi S. Amirmohammadi M et Craker L. (2013). Healing effect of hydro-alcoholic extract of *Ephedra pachyclada* Boiss. in experimentally gastric ulcer in rat. *Acta Pol Pharm*, **70**(6): 1003-1009.
- Pisoschi, A. M et Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **97**: 55–74.
- Plumlee K.H. (2004). Hepatobiliary system. In: Plumlee, K.H. (Ed.), *Clinical Veterinary Toxicology*. Mosby, St. Louis, p 61-68.
- Poljsak B., Suput D et Milisav I. (2013). Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxid. Med. Cell*, **2013**: 11.
- Poole A et Leslie G.B. (1989). A practical approach to toxicological investigations. 1st ed. Great Britain. *Cambridge University press*, **2**: 30-117.
- Popovici C., Saykova I et Tytkowski. (2010). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel*, **4**: 1-8.
- Porter PL et Wallace JW. (1988). C-glycosylflavones from species of *Ephedra*. *Biochem Syst Ecol*, **16**(3): 261-262.
- Poston I.I et Foreyt J.P (1998). Challenges in obesity management. *South Med J*, **91**(8): 710-720.
- Prior R.L., Wu X et Schaich K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem*, **53**(10): 4290–4302.
- Proestos C., Sereli D et Komaitis M. (2006). Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. *Food Chem*, **95**(1): 44–52.
- Purev O., Pospíšil F et Motl O. (1988). Flavonoids from *Ephedra sinica* Stapf. *Collect Czech Chem C*, **53**(12): 3193-3196.
- Quezel P et Santa S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS, ed, Paris.
- Rahman I et Adcock I.M. (2006). Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur Respir J*, **28**(1): 219-242.
- Rankin J.A. (2004). Biological mediators of acute inflammation. *Advanced Practice in Acute and Critical Care*, **15**(1): 3 -17.
- Rasoli S., Kakouros N., Harling L., Gukop P., Soni M., Athanasiou T et Kourliouros A. (2011). Antioxidant vitamins in the prevention of atrial fibrillation: what is the evidence?. *Cardiol. Res. Pract*, **2011**: 8.
- Rawa M.S.A., Hassan Z., Murugaiyah V., Nogawa T et Wahab H. A. (2019). Anti-cholinesterase potential of diverse botanical families from Malaysia: Evaluation of crude extracts and fractions from liquid-liquid extraction and acid-base fractionation. *Journal of Ethnopharmacol*, **245**: 112160.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* **26**(9-10): 1231–1237.
- Reichl J., Benecke N., Eckert K G., Erber B., Golly I C., Kreppel H., Liebl B., Muckte H., Szinicz L et Zilker T. (2004). Guide Pratique de Toxicologie. *DeBoeck*. 04.
- Rezzagui A., Merghem M., Derafa I et Dahamna S. (2020). Acute and Sub-acute Toxic Effects of Algerian *Peganum harmala* L. Crud Extract. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, **10**(2): 115-121.
- Rice-Evans C. (2001). Flavonoid antioxidants. *Curr. Med. Chem*, **8**(7): 797–807.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Bolwell G.P., Bramley P.M et Pridham, J.B. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic. Res*, **22**(4): 375–383.
- Richet G. (1988). Néphrologie. (ed.). Ellipses/ Aupelf, P 361.
- Riethmüller E., Tóth G., Alberti Á., Végh K., Burlini I., Könczöl Á., Balogh G.T et Ágnes K., (2015). First characterisation of flavonoid- and diarylheptanoid-type antioxidant phenolics in *Corylus*

- maxima* by HPLC-DAD-ESI-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **107**: 159–167.
- Rigato I., Ostrow J.D et Tiribelli C. (2005). Bilirubin and the risk of common nonhepatic diseases. *Trends Mol. Med.* **11**(6): 277-283.
- Riley P.A. (1994). Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* **65**(1): 27-33.
- Rimm E.B et Stampfer M.J. (2000). Antioxidants for vascular disease. *Med. Clin. North Am.* **84**(1): 239-249.
- Ringbom T., Segura L., Noreen Y., Perera P., Bohlin L. (1998). Ursolic acid from *Plantago major*, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 catalysed prostaglandin biosynthesis. *Journal of Natural Products*, **61**(10): 1212-1215.
- Rizvi S., Raza S.T., Ahmed F., Ahmad A., Abbas S. et Mahdi F. (2014). The role of vitamin E in human health and some diseases. *Sultan Qaboos Univ Med J*, **14**(2): e157-e165.
- Robards K., Prenzler P.D., Tucker G., Swatsitang P et Glover W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* **66**(4): 401–436.
- Robbins R.J. (2003). Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *J Agric Food Chem.* **51**(10): 2866-2887.
- Rodrigues S., Calhela R.C., Dueñas M., Carvalho M.A., Abreu Rui M.V., Santos-Buelga Cet Ferreira I.C.F.R. (2012). *Crataegus monogyna* buds and fruits phenolic extracts: Growth inhibitory activity on human tumor cell lines and chemical characterization by HPLC–DAD–ESI/MS. *Food Research International*, **49**(1): 516-523.
- Roh J.S., Lee H., Lim J., Kim J., Yang H., Yoon Y., Shin S.S et Yoon M. (2017). Effect of Gangjihwan on hepatic steatosis and inflammation in high fat diet-fed mice. *J Ethnopharmacol.* **206**: 315–326.
- Roquilly A et Asehounne K. (2019). Corticoïdes et sepsis. *Anesthésie & Réanimation*, **5**(3): 186-192.
- Rossiter D. (2012). South African medicines formulary (SAMF). 10th Edition. Health and Medical Publishing Group. *Cape Town*, 389-395.
- Rustaiyan A., Javidnia K., Farjam M.H., Aboee-Mehrizi F et Ezzatzadeh E. (2011a). Antimicrobial and antioxidant activity of the *Ephedra sarcocarpa* growing in Iran. *J. Med. Plants Res.* **5**(17): 4251-4255.
- Rustaiyan A., Javidnia K., Farjam M.H., Mohammadi M.K et Mohammadi N., (2011b). Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of the methanolic extracts of *Ephedra laristanica*. *J. Med. Plants Res.* **5**(24): 5713–5717.
- Rydin C., Pedersen K.R., Crane P.R et Friis E.M. (2006). Former diversity of *Ephedra* (Gnetales): Evidence from Early Cretaceous seeds from Portugal and North America. *Ann. Bot.* **98**(1): 123–140,
- Ryu S.Y., Oak M.H., Yoon S.K., Cho D.I., Yoo G.S., Kim T.S et Kim K.-M. (2000). Anti-allergic and anti-inflammatory triterpenes from the herb *Prunella vulgaris*. *Planta Medica*, **66**(04): 358–360.
- Sacher R.A et Mcpherson R.A. (1991). Widmann's clinical Interpretation of Laboratory Test. *Pennsylvania. USA.* 416-443.
- Saini R. (2011). Coenzyme Q10: The essential nutrient. *J Pharm Bioallied Sci.* **3**(3): 466-467.
- Saito I., Saruta T., Kondo K., Nakamura R., Oguro T., Yamagami K., Ozawa Y et Kato E. (1978). Serum uric acid and the renin-angiotensin system in hypertension. *J Am Geriatr Soc.* **26**(6):241–247.
- Sanghani A., Kandra T., Bavadekar S et Vansal S. (2013). Pterostilbene inhibits VEGF production in human breast cancer [MDA-MB-231] cells. *The FASEB Journal*, **27** (Meeting Abstracts Suppl), 1104-1106.
- Santos S.A.O., Freire C.S.R., Domingues M.R.M., Silvestre A.J.D et Neto C.P. (2011). Characterization of Phenolic Components in Polar Extracts of *Eucalyptus globulus* Labill.

- Bark by High-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem*, **59**(17):9386–9393.
- Sautin Y.Y et Johnson R.J. (2008). Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox, *Nucleos. Nucleot. Nucl*, **27**(6-7): 608-619.
- Scalbert A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, **30**(12): 3875-3883.
- Schroeter H., Boyd C., Spencer J.P.E., Williams R.J., Cadenas E et Rice-Evans C. (2002). MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiol. Aging*, **23**(5): 861–880.
- Schug S.A et Goddard C. (2014). Recent advances in the pharmacological management of acute and chronic pain. *Ann Palliat Med*, **3**(4): 263–275.
- Seet R.C.S., Lee C.Y.J., Lim E.C.H., Tan J.J.H., Quek A.M.L., Chong W.L., Looi W.F., Huang S.H., Wang H., Chan Y.H et Halliwell B. (2010). Oxidative damage in Parkinson disease: measurement using accurate biomarkers. *Free Radic. Biol. Med*, **48**(4): 560-566.
- Sequeira S., Rao A.V., Rao A. (2012). Increased oxidative stress and altered antioxidants status in patients with chronic allergic rhinitis. *Adv. Biosci. Biotechnol*, **3**: 951-956.
- Serrano J.J. (1990). Toxicopharmacologie expérimentale des plantes médicinales. Actes du 1er colloque européen d'ethnopharmacologie. Office de la recherche scientifique d'outre-mer (ORSTOM). 210-218.
- Setty A.R et Sigal L.H. (2005). Herbal Medications Commonly Used in the Practice of Rheumatology: Mechanisms of Action, Efficacy, and Side Effects. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, **34**(6): 773-784.
- Shah B., Seth A et dan Maheshwari K. (2011). A Review on Medicinal Plants as a resource of Antiinflammatory Agents. *Res J Med Plant*, **5**(2): 101-15.
- Shah S., Mohan M M., Kasture S., Sanna C et Maxia A. (2009). Protective Effect of *Ephedra nebrodensis* on Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Rats. *Iranian Journal Of Pharmacology & Therapeutics*, **8**(2): 61-0
- Shahidi F et Ambigaipalan P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects- A review. *Journal of Functional Foods*, **18**: 820–897.
- Shahidi F et Chandrasekara A. (2013). Millet grain phenolics and their role in disease risk reduction and health promotion: A review. *Journal of Functional Foods*, **5**(2): 570-581.
- Shahidi F et Naczki M. (2004). Phenolics in food and nutraceuticals. CRC Press., Boca Raton, FL, 1-558.
- Shahidi F. (2015). Antioxidants: Principles and applications. F. Shahidi (Ed.), Handbook of antioxidants for food preservation, Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, UK. 1-14.
- Shahidi F., McDonald J., Chandrasekara A et Zhong Y. (2008). Phytochemicals of foods, beverages and fruit vinegars: Chemistry and health effects. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, **17**: 380-382.
- Shahraki M.H., MirShekari H et J Palan M. (2006). The comparison of nociceptive effect of *Teucrium polium* and morphine in female rats. *The Horizon of Medical Sciences*, **12**(1):10-14.
- Siddhuraju P et Becker K. (2003). Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of Drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *J. Agric. Food Chem*, **51**(8): 2144- 2155.
- Siddhuraju P et Becker K. (2007). The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. *Food Chem*, **101**(1): 10-19.
- Siddiqui F., Naqvi S., Abidi L., Faizi S., Avesi L. (2016). *Opuntia dillenii* cladode: Opuntiol and opuntioside attenuated cytokines and eicosanoids mediated inflammation. *J. Ethnopharmacol*, **182**: 221–234.
- Silva B.A., Ferreres, F., Malva J.O et Dias A.C. (2005). Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. *Food Chem*, **90**(1-2): 157-167.

- Sivaranjani N., Venkata R.S et Rajeev G. (2013). Role of reactive oxygen species and 806 antioxidants in atopic dermatitis. *J Clin Diagnostic Res*, **7**(12): 2683–2685.
- Slauch J.M. (2011). How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question. *Mol Microbiol*. **80**(3): 580-583.
- Slichter S.J. (2004). Relationship between platelet count and bleeding risk in thrombocytopenic patients. *Transfusion Medicine Reviews*, **18**(3): 153–167.
- Son Y., Cheong Y.K., Kim N.H., Chung H.T., Kang D.J et Pae H.O. (2011). Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species: How Can ROS Activate MAPK pathways?. *J Signal Transduct*, **2011**: 1-6.
- Sonboli A., Kanani M.R., Yousefzadi M et Mojarad M. (2009). Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Salvia hydrangea* from Two Localities of Iran. *JMP*, **2**(30): 20-172.
- Stehbens W.E. (2004). Oxidative stress in viral hepatitis and AIDS. *Exp. Mol. Pathol*, **77**(2): 121-132.
- Stein C et Lang L.J. (2009). Peripheral mechanisms of opioid analgesia. *Curr. Opin. Pharmacol*, **9**(1): 3–8.
- Stevens C.D. (2010). Clinical immunology and serology. Therd edition, F.A. Davis Company Philadelphia. 2-10.
- Su W., Mao Z., Liu Y., Zhang X., Zhang W., Gustafsson J et Guan Y. (2019). Role of HSD17B13 in the liver physiology and pathophysiology. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **489**: 119-125.
- Sun T et Ho C.T. (2005). Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chem*, **90** (4): 743-749.
- Sung C.C., Hsu Y.C., Chen C.C., Lin Y.F. et Wu C.C. (2013). Oxidative Stress and Nucleic Acid Oxidation in Patients with Chronic Kidney Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2013**: 1–15.
- Sureka M., Sumathi R et Kanagavalli U. (2016). A Comprehensive Review on Cardiotoxic Drugs and Cardioprotective Medicinal Plants. *International Journal of Pharma Research & Review*, **5**(10): 21-34.
- Swenson M.J et Reece O.W. (1993). Duke's Physiology of Domestic Animals. *Ithaca: Comstock Publishing Associates*. 312-315.
- Tabuti J.R.S., Lye K.A et Dhillion S.S. (2003) .Traditional herbal drugs of Bulamogi, Uganda : plants, use and administration. *Journal of Ethnopharmacol*, **88**(1): 19-44.
- Taherian A.A., Dehghanina M., Vafaei A.A., Sadeghi H.A.S.AN et Miladi Gorgi H. (2007). Effects of aqueous extract of fruit of *Foeniculum vulgare* on neurogenic and inflammatory pain in mice. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences SJKU*, **12**(2): 29-36.
- Tamura E.K., Jimenez R.S., Waismam K., Gobbo-Netoc L., Lopes N.P., Malpezzi-Marinho E.A.L., Marinho E A.V et Farsky S.HP. (2009). Inhibitory effects of *Solidago chilensis* Meyen hydroalcoholic extract on acute inflammation. *J Ethnopharmacol*, **122**(3): 478–485.
- Tan P.H., Kuo J.H., Liu K., Hung C.C., Tsai T.C et Deng T.Y. (2000). Efficacy of intrathecal neostigmine for the relief of postinguinal herniorrhaphy pain. *Acta Anaesthesiol Scand*, **44**(9): 1056–1060.
- Tao H., Wang L et Cui Z. (2010). Study on chemical constituents of root of *Ephedra sinica* . *Chin Tradit Herb Drugs*, **41**(4): 533-536.
- Tao H.M., Zhu Q.H et Liu Y.H. (2011). Flavonoids from roots of *Ephedra sinica*. *Chin Tradit Herb Drugs*, **42**(9): 1678-1682.
- Teponno R.B., Kusari S et Spitteller M. (2016). Recent advances in research on lignans and neolignans. *Nat Prod Rep*, **33**(9):1044–1092.
- The Organisation of Economic Co-operation Development (OECD). (2001). The OECD Guideline for the Testing Chemical: 407 Repeated Dose Oral Toxicity-Rodent 28-Day or 14 Day Study. OECD, Paris, 1-7.

- Thelingwani R et Masimirembwa C. (2014). Evaluation of herbal medicines: value addition to traditional medicines through metabolism, pharmacokinetic and safety studies. *Curr. Drug Metabol*, **15**(10): 942–952.
- Theoharides T.C. (1997). Sudden death of a health college student related to ephedrine toxicity from a Ma Huang-containing drink. *J Clin Psychopharmacol*, **17**(5): 437 – 439.
- Thombre N.A., Gaikwad S.M. et Chaudhari, K.S. (2019). A Review on Analgesic Herbals. *Pharma Tutor*, **7**(4) : 37-41.
- Timbrell J. (2002). Introduction to toxicology. 3rd edition., London, *Taylor & Francis*. 163-179.
- Toda S. (2011). Polyphenol content and antioxidant effects in herb teas. *Chin. Med*, **2**(1): 29-31.
- Toro J. et Rodrigo R. (2009). Oxidative stress: basic overview. In Rodrigo R. Oxidative stress and antioxidants: their role in human disease. First edition, Nova Biomedical Books : New York. 1- 24.
- Torres P., Poveda A., Jimenez-Barbero J., Ballesteros A et Plou F.J. (2010). Regio selective lipase-catalyzed synthesis of 3-O-acyl derivatives of resveratrol and study of their antioxidant properties. *J. Agric. Food Chem*, **58**(2): 807-813.
- Tostes R.C., Carneiro F.S., Lee A.J et Giachini F.R. (2008). Cigarette smoking and erectile dysfunction: focus on NO bioavailability and ROS generation. *Journal of Sexual Medicine*, **5**(6):1284-1295.
- Traesel G.K., Souza J.C.D., Barros A.L.D., Souza M.A., Schmitz W.O., Muzzi R.M., Oesterreich, S.A., Arena, A.C. (2014). Acute and subacute (28 days) oral toxicity assessment of the oil extracted from *Acrocomia aculeata* pulp in rats. *Food Chem. Toxicol*, **74**: 320-325.
- Treinen-Moslen M. (2001). Toxic responses of the liver. sixth edition. In: Klaassen, C. D. (Ed.), Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. McGraw Hill, Columbus, OH. 471-489.
- Utoh-nedosa A.U., Akah P.A., Okoye T.C., Okoli C.O. (2009). Evaluation of the toxic effects of dihydroartemisinin on the vital organs of Wistar albino rats. *Am. J. Pharmacol. Toxicol*, **4**(4): 169–173.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M et Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell. Biol*, **39**(1): 44-84.
- Varma V., Varma M., Sarkar P.D., Varma A., Vyas S et Kulkarni R. (2014). Correlation of vitamin C with HbA1C and oxidative stress in diabetes mellitus with OR without nephropathy. *Nat J Med Res*, **4**: 151-155.
- Vaškova J., Vaško L. et Kron I. (2012). Oxidative processes and antioxidant metaloenzymes. First edition. In ElMissiry M.A. Antioxidant enzyme. *InTech : Croatia*.19-58.
- Verma-Gandhu M., Bercik P., Motomura Y., Verdu E. F., Khan W. I., Blennerhassett P.A., Wang L., El-Sharkawy R.T et Collins S.M. (2006). CD4+ T-cell modulation of visceral nociception in mice. *Gastroenterology*, **130**(6): 1721–1728.
- Vestweber D. (2015). How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nat Rev Immunol*, **15**(11): 692–704.
- Viala A. (2007). Définition, domaine de la toxicologie, notions sur la toxicité dans Viala A., Botta A. Toxicologie, éditions Tec et Doc et éditions Médicales Internationales. 06.
- Vinutha B., Prashanth D., Salma, K., Sreeja S.L., Pratiti D., Padmaja R., Radhika S., Amit A., Venkateshwarlu K et Deepak, M. (2007). Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *J Ethnopharmacol*, **109**(2): 359-363.
- Wakai K., Ando M., Ozasa K., Ito Y., Suzuki K., Nishino Y et Ohno, Y. (2005). Updated information on risk factors for lung cancer: findings from the JACC study, *J. Epidemiol*, **15**(Supplement_II): S134-S139.
- Wang H et Helliwell K. (2001). Determination of flavonols in green and black tea leaves and green tea infusions by high-performance liquid chromatography. *Food Res. Int*, **34**(2-3): 223–227.

- Washington I. M et Van Hoosier G. (2012). *Clinical Biochemistry and Hematology. The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*. Academic Press, 57–116.
- Weinberg J.M. (2005). The Cellular Basis of Nephrotoxicity, dans Hillal G, Albert C, Vallée M. 2005. Mécanismes impliqués dans la néphrotoxicité, *Ann Biol Clin Québec*, **42**(3): 29.
- Wellman P.J., Miller D.K., Livermore C.L., Green T.A., McMahon L.R et Nation J.R. (1998). Effects of (-)-ephedrine on locomotion, feeding, and nucleus accumbens dopamine in rats. *Psychopharmacology*, **135**(2): 133–140.
- White P.F. (2006). The changing role of non-opioid analgesic techniques in the management of postoperative pain. *Anesth Analg*, **101**(5S): S5–22.
- Whitehouse A.M. (1987). Ephedrine psychosis rediscovered. *Br J Psychiatry*, **150**(2):258- 261.
- Wilson N.H., Hardisty J.F et Hayes J.R. (2001). Short-term, subchronic and chronic toxicology studies. 4th edition. In: Hayes AW. Principles and methods of toxicology. Philadelphia, PA: *Taylor and Francis*. 754.
- Witthawasku P., Ampai P., Kanjanapothi D., Taesothikul T et Lertprasertsuke. (2003). Acute and subacute toxicities of saponin mixture isolated from *Schefflera leucantha* Viguiet. *J. ethnopharmacol*, **89**(1): 115-121.
- Witztum J.L et Berliner J.A. (1998). Oxidized phospholipids and isoprostanes in atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol*, **9**(5): 441-448.
- World Health Organization. (1989). Medicinal plants of China (WHO Regional Publications Western Pacific Series, No.2). Manila: WHO.
- Xia Y., Kuang H., Yang B., Wang Q., Liang J., Sun, Y et Wang Y. (2011). Optimum extraction of acidic polysaccharides from the stems of *Ephedra sinica* Stapf by Box–Behnken statistical design and its anti-complement activity. *Carbohydrate Polymers*, **84**(1): 282-291.
- Xiang F., Peng L., Yin Z., Jia R., Hu Z., Li Z., Ni X., Liang X., Li L., He C., Yin L., Su G et Lv C., (2015). Acute and subchronic toxicity as well as evaluation of safety pharmacology of *Galla chinensis* solution. *J. Ethnopharmacol*, **162**: 181–190.
- Xiao J.B et Hogger P. (2015). Dietary polyphenols and type 2 diabetes: current insights and future perspectives. *Curr Med Chem*, **22**(1): 23–38.
- Xiu L.M., Miura A.B., Yamamoto K., Kobayashi T., Song Q.H., Kitamura H et Cyong J.C. (2001). Pancreatic islet regeneration by ephedrine in mice with streptozotocin-induced diabetes. *Am J Chin Med*, **29**(03-04): 493–500.
- Xu J., Chen S et Hu, Q. (2005). Antioxidant activity of brown pigment and extracts from black sesame seed (*Sesamum indicum* L.). *Food Chem*, **91**(1): 79–83.
- Xu W.H., Zhao P., Wang M et Liang, Q. (2018). Naturally occurring furofuran lignans: structural diversity and biological activities. *Natural Product Research*, **33**(9): 1–17.
- Xu G., Ye X., Liu D et Ma Y., Chen J. (2008). Composition and distribution of phenolic acids in Ponkan (*Citrus poonensis* Hort. ex Tanaka) and Huyou (*Citrus paradisi* Macf. Changshanhuoyou) during maturity. *Journal of Food Composition and Analysis*, **21**(5):382-389.
- Yaici K., Dahamna S., Moualek I., Belhadj H., Houali K. (2019). Evaluation of the Content of Phenolic Compounds, Antioxidant and Antimicrobial Properties of *Erica arborea* L. (Ericaceae) in Traditional Medicine of Setifian Tell in the East Algerian. *Phytothérapie*, **16**: 353-364.
- Yam M.F., Ang L.F et Ameer O.Z. (2009). Anti-inflammatory and analgesic effects of *Elephantopus tomentosus* ethanolic extract. *Journal of Acupuncture & Meridian Studies*, **2**(4): 280–287.
- Yang B., Chen F., Hua Y., Huang S.S., Lin S., Wen L et Jianga Y. (2012). Pro oxidant activities of quercetin, *p*-coumaric acid and their derivatives analysed by quantitative structure–activity relationship. *Food Chem*, **131**(2): 508–512.
- Yasuko K., Tomohiro N., Sei-Itsu M., Ai-Na L., Yasuo F et Takashi T. (1984). Caffeic acid is a selective inhibitor for leukotriene biosynthesis. *Biochimica Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, **792**(1): 92-97.

- Yeo J et Shahidi F. (2015). A critical evaluation of changes in the ratio of insoluble-bound to soluble phenolics on antioxidant activity of lentils during germination. *J. Agric. Food Chem*, **63**(2): 379-381.
- Yeung H.C. (1985). Handbook of Chinese Herbs and Formulas. Los Angeles. Institute of Chinese Medicine.
- Young B., Lowe J.S., Stevens A et Heath J.W. (2008). Atlas d'histologie fonctionnelle de Wheater. 2^{ème} édition. *DeBoeck supérieur*. 288, 294, 402.
- Yousri R., Noaman E., El Shawi O., Fahmy N et Ghaz M. (2011). Evaluation of antioxidant status and radioprotective activity of a novel anti-cancer drug in mice. *J. Cancer Ther*, **2011**: 616-628.
- Zardooz H., Shams J., Izadi H.R., Ghoshooni H., Arbabian S., Kamalinejad M., et al. (2009). Effect of water extract of saffron (*Crocus sativus*) on chronic phase of formaline test in female mice. *Kowsar J*, **14**: 11-8.
- Zareian P., Esmaeili Mahani S et Taherianfard M. (2003). The effect of licorice root extract on acute and chronic pain. *J Med Fac*, **10**: 851-857.
- Zeashan H., Amresh G., Singh S et Rao C.V. (2008). Hepatoprotective activity of *Amaranthus spinosus* in experimental animals. *Food Chem Tox*, **46**(11): 3417-3421.
- Zekkour M. (2008). Les risques de la phytothérapie, Monographies des plantes toxiques, les plus usuelles au Maroc. Thèse de Doctorat Pharmacie. Université Mohamed V-Souissi. P125.
- Zendehdel K.M., Ghahari J., Vaezi G.H et Shariatifar N. (2009). The study of hydroalcoholic extract of *Ziziphora tenuior* on visceral pain with writhing test in mice. *The Horizon of Medical Sciences*, **15**: 24-29.
- Zengin G., Mahomoodally F., Picot-Allain C., Diuzheva A., Jekő J., Cziáky Z., Cvetanović A., Aktumsek A., Zeković Z.R.R et Rengasamy K. (2019). Metabolomic profile of *Salvia viridis* L. root extracts using HPLC-MS/MS technique and their pharmacological properties: A comparative study. *Ind. Crops Prod*, **131**: 266-280.
- Zhang B., Deng Z., Ramdath D.D., Tang Y., Chen P.X., Liu R., Lui Q et Tsao, R. (2015). Phenolic profiles of 20 Canadian lentil cultivars and their contribution to antioxidant activity and inhibitory effects on α -glucosidase and pancreatic lipase. *Food Chem*, **172**: 862-872.
- Zhang B.M., Wang Z.B., Xin P., Wang Q.H., Bu H et Kuang, H.X. (2018). Phytochemistry and pharmacology of genus *Ephedra*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, **16**(11): 811-828.
- Zhang J, Chen J, Liang Z, Zhao C. (2014). New lignans and their biological activities. *Chem Biodivers*, **11**(1):1-54.
- Zhang J., Wang X., Vikash V., Ye Q., Wu D., Liu Y et Dong W. (2016). ROS and ROS-mediated cellular signaling. *Oxid Med Cell Longev*, **2016**: 1-18.
- Zhao W., Deng A.J., Du G.H., Zhang J.L., Li Z.H et Qin H.L. (2009). Chemical constituents of the stems of *Ephedra sinica*. *J Asian Nat Prod Res*, **11**(2): 168-171.
- Zhou K et Yu L. (2006). Total phenolic contents and antioxidant properties of commonly consumed vegetables grown in Colorado. *LWT - Food Science and Technology*, **39**(10): 1155-1162.
- Ziani B.E.C., Heleno S.A., Bachari, K., Dias M.I et Ferreira I.C.F. (2018). Phenolic compounds characterization by LC-DAD-ESI/MSⁿ and bioactive properties of *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut and *Ephedra alata* Decne. *Food Res. Int*, **116**: 312-319.

ملخص

الهدف من هذا البحث هو تقييم الخصائص المضادة للأكسدة باستعمال اختبار DPPH ، ABTS ، CUPRAC ، FRAP ، استخلاص الحديد و-β-كاروتين / حمض اللينوليكي) ، وكذلك المضادة للكلينسترانز ، المضادة للإلتهاب و التأثير المسكن للألم للمستخلصات الهيدرو كحولية و المستخلص المائي (EtOH، MeOH، EtAc، EtOAc و AQ) و أجزاء من *Ephedra nebrodensis* كما تم تقييم سمية المستخلص (AQ) . فانه أنه لأول مرة تمت دراسة السمية والنشاطات البيولوجية للمستخلص (AQ). أظهرت نتائج التحليل الكمي الفيتوكيميائي (تحديد المركبات الفينولية (CP) ، الفلافونويدات الكلية (FT) ، الديباغ الكلية (TT) أن المستخلص و الجزء أسيتات الإيثيلي (EA) هو الأغنى بـ (CP) و (FT) بمحتويات تقدر بـ 238.45 ± 1.50 و 269.669 ± 0.031 ميكروغرام موافق للحمض الغاليك / ملغ من المستخلص و 21.13 ± 0.00 و 44.507 ± 0.003 ميكروغرام موافق للكروستين / ملغ من المستخلص، على التوالي من ناحية أخرى، تنسب أعلى المستويات في الديباغ إلى المستخلص MeOH و الجزء EA بمحتوى قدر بـ 89.07 ± 1.57 و 228.487 ± 1.362 ميكروغرام موافق للحمض التانيك / ملغ من المستخلص. تحليل GC-MS للمستخلصات السيليلية يسمح بتحديد القلويدات (الإيفيدرين ، البسودايفيدرين والنورإيفيدرين) ، الفلافونول (الكاتيشين والإبيغالوكاتيشين) وحمض البروتوكاتشيك. حدد تحليل HPLC-MS للمستخلصات EtOH، MeOH، EtOAc ، EtAc و AQ 22 مركباً فينولياً ، بما في ذلك خمسة فلافون جليكوسيدات وثلاثة فلافونول رينتوزيدات وثلاثة فلافونول غليكوزيدات وواحد فلافونول غليكورونيد وثلاثة أحماض هيدروسيناميكية وحمضان فينوليان. أظهرت نتائج الأنشطة البيولوجية مخبرياً أن مستخلصات EtOAc و EAC هي الأكثر نشاطاً في معظم الاختبارات المدروسة. تظهر نتائج النشاط الإنزيمي أن معظم المستخلصات تظهر تثبيطاً قوياً يصل إلى 99٪ ضد بوتيريل كولينستراز (BchE) مقارنةً بأسيثيل كولينستراز (AchE). تملك المستخلصات EtOH و MeOH أعلى تأثير مضاد للالتهابات مخبرياً مع نسبة تثبيط تتراوح من 56٪ إلى 82٪. من ناحية أخرى ، فإن معالجة الفئران بالمستخلصات المدروسة (400 مغ / كغ) يثبط الالتهاب الناتج عن زيت الكروتون والألم الناتج عن حمض الأسيتيك بنسب تثبيط بين (37.96٪ إلى 72.22٪) و (50.29٪ إلى 74.26٪) على التوالي. بالنسبة للسمية الحادة ، تسببت جرعات 2000 و 5000 ملغ / كغ من المستخلص (AQ) في حدوث تغيير في وزن جسم الحيوانات و لوحظ تلف طفيف في الكبد والكلى عند جرعة 5000 ملغ / كغ ، والجرعة المميتة (LD₅₀) كانت أكبر من 5000 ملغ / كغ. في السمية فوق الحادة ، لم يلاحظ أي تغيير في مؤشرات الدم عند الإناث ، ومن ناحية أخرى تم تسجيل انخفاض في GB بالنسبة لذكور الجرذان ، وبعض التغيرات في توازن الدهون ومستوى ALAT عند ذكور الجرذان بجرعة 1200 ملغ / كغ. أخيراً ، المعالجة بالمستخلص (AQ) بجرعات 300 ، 600 و 1200 ملغ / كغ لمدة 90 يوماً يمكن أن تسبب تغييرات في بعض المؤشرات الدموية والبيوكيميائية بجرعة 1200 ملغ / كغ. في الختام ، مستخلصات *E. nebrodensis* تظهر أنشطة بيولوجية مثيرة للاهتمام ، بالإضافة إلى أن المستخلص (AQ) ليس سام على المدى القصير والطويل بجرعات متكررة تصل إلى 600 ملغ / كغ

الكلمات المفتاحية: *Ephedra nebrodensis* ، دراسة الكيمائية ، الأنشطة البيولوجية ، السمية الحادة وفوق الحادة ، السمية المزمنة ، مستخلصات.

Résumé

Le but de cette recherche est d'évaluer les propriétés antioxydantes en utilisant les tests : DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP, chélation de fer et β-carotène/acide linoléique, en plus de l'activité anti-cholinestérase, anti-inflammatoire et analgésique des extraits hydro-alcooliques et aqueux (EtOH, MeOH, EtAc, EtOAc et AQ) et les fractions d'*Ephedra nebrodensis*. La toxicité de l'extrait (AQ) a été également évaluée. Signalant que pour la première fois la toxicité et les activités biologiques de l'extrait (AQ) ont été étudiées. Les résultats de l'analyse phytochimique quantitative (dosage des composés phénoliques (CP), flavonoïdes totaux (FT) et tanins totaux (TT) ont montré que l'extrait et la fraction d'acétate d'éthyle (AE) sont les plus riches en CP et en FT avec des teneurs de (238.45 ± 1.50 et 269.669 ± 0.031 µg EAG/mg d'extrait) et (21.13 ± 0.00 et 44.507 ± 0.003 µg EQ/mg d'extrait), respectivement, par contre les taux les plus élevés en tanins sont attribués à l'extrait MeOH et la fraction AE avec une teneur de 89.07 ± 1.57 et 228.487 ± 1.362 µg EAT/mg d'extrait. L'analyse GC-MS des extraits sylvilés a permis l'identification des alcaloïdes (éphedrine, pseudo-éphedrine et nor-éphedrine), des flavonols (catéchine et epigallocatechine) et l'acide protocatichique. L'analyse par HPLC-MS des extraits EtOH, MeOH, EtOAc, EtAc, et AQ a identifiée 22 composés phénoliques, dont cinq flavones glucoside, trois flavonols rutinoside, quatre flavonols glucoside, trois flavonols rhamnoside, un flavonol glucuronide, un flavone glucuronide, trois acides hydro-cinnamiques et deux acides phénoliques. Les résultats des activités biologiques *in vitro* ont montré que les extraits EtOAc et EtAc sont les plus actifs dans la plupart des tests étudiés. Les résultats de l'activité enzymatique révèlent que la plupart des extraits présentent une meilleure inhibition qui peut aller jusqu'à 99% contre la butyrylcholinestérase (BchE) que l'acétylcholinestérase (AchE). Les extraits EtOH, EtAc et MeOH possèdent l'effet anti-inflammatoire *in vitro* le plus élevé avec un pourcentage d'inhibition qui varie de 56% à 82%. Par contre le traitement des souris par les extraits (400 mg/kg) a inhibé l'inflammation induite par l'huile de coton et la douleur induite par l'acide acétique avec des pourcentages d'inhibition respectifs (37.96% à 72.22%) et (50,29% à 74,26%). Pour la toxicité aiguë, les doses de 2000 et 5000 mg/kg de l'extrait (AQ) ont provoquées un changement du poids corporel des animaux et des légères lésions du foie et du rein à la dose de 5000 mg/kg ont également été observées, donc la dose létale (DL₅₀) était supérieure à 5000 mg/kg. Dans la toxicité subaiguë, aucun changement dans les paramètres hématologiques n'a été observé chez les femelles, par contre une diminution des GB a été signalée chez les rats mâles, quelques changements dans le bilan lipidique et le taux d'ALAT chez les rats mâles à la dose de 1200 mg/kg. Enfin le traitement par l'extrait (AQ) à des doses de 300, 600 et 1200 mg/kg/jour pendant 90 jours pourrait provoquer des altérations de quelques paramètres hématologiques et biochimiques à la dose 1200 mg/kg. En conclusion, les extraits d'*E. nebrodensis* présentent des activités biologiques intéressantes. De plus l'extrait (AQ) n'est pas toxique (à court terme et à long terme) et à des doses répétés jusqu'à 600 mg/kg.

Mots clés : *Ephedra nebrodensis*, Etude phytochimique, Activités biologiques, Toxicité aiguë et subaiguë, Toxicité chronique, Extraits.

Abstract

The aim of this research is to evaluate the antioxidant activities using different tests (DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP, iron chelation and β-carotene/linoleic acid), anti-cholinesterase, anti-inflammatory and analgesic properties of hydroalcoholic and aqueous (EtOH, MeOH, EtAc, EA and AQ) extracts and fractions of *Ephedra nebrodensis*. The toxicity of the (AQ) extract was also evaluated. Signaling that for the first time the toxicity and biological activities of the (AQ) extract were studied. The results of the quantitative phytochemical analysis determination of phenolic compounds (PC), total flavonoids (TF) and total tannins (TT) showed that ethyl acetate (EtOAc) extract and fraction are the richest in PC and TF with contents of 238.45±1.50 µg EAG/mg of dry extract and 21.13±0.00 µg EQ/mg of dry extract, respectively Whereas the highest tannin levels are attributed to the MeOH extract and EA fraction with a content of 89.07 ± 1.57 and 228.487 ± 1.362 µg EAT/mg of dry extract. GC-MS analysis of the sylvile extracts enabled the identification of alkaloids (ephedrin, pseudo-ephedrin and nor-ephedrin), flavonols (catechin and epigallocatechin) and protocatichic acid. HPLC-MS analysis of EtOH, MeOH, EtOAc, EtAc, and AQ extracts identified 22 phenolic compounds, including five flavone glucoside, three flavonol rutinoside, four flavonol glucoside, three flavonol rhamnoside, one flavonol glucuronide, one flavone glucuronide, three hydrocinnamic acid and two phenolic acids. The results of *in vitro* biological activities have shown that EtOAc and EtAc extracts are the most active in most of the tests studied. Enzyme activity results reveal that most extracts show better inhibition of up to 99% against butyrylcholinesterase (BchE) than acetylcholinesterase (AchE). EtOH, EtAc and MeOH extracts have the highest *in vitro* anti-inflammatory effect with an inhibition percentage that ranges from 56% to 82%. On the other hand, the treatment of mice with the extracts (400 mg/kg) inhibited the inflammation induced by cotton oil and the pain induced by acetic acid with respective inhibition percentages (37.96% to 72.22%) and (50.29% to 74.26%). For acute toxicity, doses of 2000 and 5000 mg/kg of the (AQ) extract caused a change in the body weight of the animals and slight lesions of the liver and kidney at the dose of 5000 mg/kg were also observed, therefore the lethal dose (LD₅₀) was higher than 5000 mg/kg. In sub-acute toxicity, no changes in hematological parameters was observed in females, however, decreased in WBCs were reported in male rats, some changes in lipid balance and ALAT levels in male rats at 1200 mg/kg. Finally, treatment with the (AQ) extract at doses of 300, 600 and 1200 mg/kg/day for 90 days could cause alterations in some hematological and biochemical parameters at the 1200 mg/kg dose. In conclusion, *E. nebrodensis* extracts present interesting biological activities. Moreover, the (AQ) extract is non-toxic (short term and long term) at repeated doses up to 600 mg/kg.

Key words: *Ephedra nebrodensis*, Phytochemical study, Biological activities, Acute and subacute toxicity, Chronic toxicity, Extracts.