

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE KASDI MERBAH – OUARGLA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES



Mémoire En vue de l'obtention du diplôme de MASTER

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Thème :

**Activités biologiques de différents extraits d'*Euphorbia*
guyoniana Boiss. & Reut.**

Présenté par :

ALI Radja & BETTAYEB Imane

Soutenu le :

Devant le jury composé de :

Mme. ANNOU Ghania	MCB	UKMO	Présidente
Melle. TELLI Alia	MCB	UKMO	Promotrice
Mme. SAYAH Zineb	MCB	UKMO	Examinatrice

Année universitaire: 2020/2021

Remerciements

*Nos remerciements les plus sincères et les plus chaleureux
s'adressent :*

*A ALLAH le tout puissant qui nous a permis d'être ce que
nous sommes aujourd'hui.*

*Car l'homme propose mais ALLAH dispose. Seigneur,
veuillez toujours diriger nos pas.*

*Nous tenons à adresser nos très sincères remerciements à
Notre directrice de Mémoire madame **Dr. TELLI ALIA**,
maître de conférences B au département des Sciences
Biologiques, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie,
Université Kasdi Merbah-Ouargla, qui nous a guidé dans
notre travail, Merci pour nous avoir accordé votre temps,
Merci d'avoir été très patiente avec nous, Merci pour
d'avoir mis votre expérience à notre profit.*

*Nous tenons aussi à présenter notre sincère et vif
remerciement aux membres de jury **Dr. ANNOU Ghania**
et **Dr. SAYEH Zineb**, maîtres de conférences B au
département des Sciences Biologiques, Faculté des Sciences
de la Nature et de la Vie, Université Kasdi Merbah-
Ouargla, qui ont accepté de juger Notre travail.*

BELTTAYB Imane & ALI Raja

Dédicace 1

J'ai l'honneur de dédie ce modeste travail à mes chers parents, qui m'avez dirigé et suivi pondent toute mes années d'étude et surtout ma mère pour Leurs sacrifices de tous les instants, sa patience sans limite et l'éducation qu'elle m'a donnée, je lui dit merci mille fois.

Je ne pourrai jamais oublier d'exprimer ma profonde gratitude à:

Mes sœurs : KARIMA. NAWAL. WISSAL

Et A mon binôme IMANE

Je vous remercie pour votre soutien moral, ta patience et votre dévouement

à ce travail, Je vous dédie le fruit de nos efforts

ALI Raja



Dédicace 2

Je dédie ce modeste travail :

A ma fleur de mes espérances, la source de la tendresse à la plus belle personne, à ma mère qui m'a donné l'espoir et le courage nécessaire pendant mon long trajet d'étude.

A celui qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger, à mon père je vous estime fort.

A la lumière de ma vie, mon homme pour la patience et le soutien dont il a fait preuve pendant toute la durée de ce travail.

A mes chères sœurs et surtout le plus chère de mon cœur :

Rania

A mon seul frère

A mon binôme Raja, je vous remercie pour votre soutien moral, ta patience et votre dévouement à ce travail, je vous dédie le fruit de nos efforts.

Et tous ceux qui m'ont encouragé tout au long de mes études.

BETTAYEB Imane

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
I	Résultats de criblage phytochimique des différents extraits d'Euphorbia guyoniana.	34
II	Valeurs d'IC50 des différents extraits d'Euphorbia guyoniana ainsi que les standards (Trolox et acide gallique) pour le test ABTS.	46
III	Valeurs d'IC50 des différents extraits d'Euphorbia guyoniana ainsi que les standards (Trolox et acide gallique) pour le test DPPH.	49
IV	Matrice de corrélation (Pearson) (P) de différents paramètres étudiés pour l'extrait méthanolique	50
V	Coefficients de détermination (Pearson) (r) de différents paramètres étudiés pour l'extrait méthanolique	51

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Cartes de répartition géographique d' <i>Euphorbia guyoniana</i> Boiss. & Reut (A et B)	12
02	<i>Euphorbia guyoniana</i> (Boiss. & Reut.) Au stade floraison	13
03	Les feuillets d' <i>Euphorbia guyoniana</i> Boiss. & Reut	14
04	Fleur et ovaire d' <i>Euphorbia guyoniana</i> Boiss. & Reut.	15
05	fruit d' <i>Euphorbia guyoniana</i> Boiss. & Reut	16
06	<i>Euphorbia guyoniana</i> Boiss. & Reut(A et B)	17
07	Différents extraits d' <i>Euphorbia guyoniana</i> Boiss. & Reut (ALi et Beltayeb, 2021).	18
08	Schéma présente le principe de test ABTS	25
09	Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH (2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl)	27
10	Schéma général de différentes étapes suivies durant l'extraction des principes actifs de la partie aérienne d' <i>Euphorbia guyoniana</i> Boiss. & Reut, leur quantification et l'évaluation de leurs activités biologiques	30
11	Rendement d'extraction des différents extraits d' <i>Euphorbia guyoniana</i> .	32
12	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.	37
13	Teneur en polyphénols totaux des différents extraits de la partie aérienne d' <i>Euphorbia guyoniana</i>	38
14	Courbe d'étalonnage de la rutine.	40
15	Teneur en flavonoïdes des différents extraits d' <i>Euphorbia guyoniana</i>	40
16	Courbe d'étalonnage de l'acide caféique .	42
17	Teneur en acides phénols des différents extraits d' <i>Euphorbia guyoniana</i> .	42
18	courbe d'étalonnage de la Trolox pour l'activité antioxydant de test ABTS	44
19	Activité anti-oxydante évaluée par le test ABTS des différents extraits d' <i>Euphorbia guyoniana</i>	45
20	courbe d'étalonnage de la Trolox pour l'activité antioxydant de test DPPH	47

21	Activité anti-oxydante évaluée par le test DPPH des différents extraits d' <i>Euphorbia guyoniana</i>	48
22	Activité antibactérienne des différents extraits d' <i>Euphorbia guyoniana</i>	52

Liste des abréviations

AAO	Activité antioxydant
ABTS	L'acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
AG	Acide gallique
Boiss. & Reut	Boissier & Reuter
CF	Chloroforme
DPPH	2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle
DCM	Dichlorométhane
DO	Densité optique
DMSO	Diméthyle sulfoxyde
EAC /g	Equivalent acide caféique par gramme
EAG /g	Equivalent acide gallique par gramme
ER/g	Equivalent rutine par gramme
IC ₅₀	Concentration inhibitrice à 50%
Log P	Coefficient de partition
MeOH	Méthanol (Hydroxyde de sodium)
Trolox	acide carboxylique 6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetraméthylchromane

Liste des annexes

N°	Titre	page
01	Equipements et appareils utilisé durant l'étude.	69
02	étapes d'extraction liquide-solide d' <i>Euphorbia guyoniana</i> Boiss. & Reut.	72
03	Réactifs chimique utilisé pour le Criblage phytochimique d' <i>Euphorbia guyoniana</i> Boiss. & Reut.	74
04	criblage phytochimique des extraits d' <i>Euphorbia guyoniana</i> Boiss. & Reut.	75
05	Réactifs chimique utilisé pour le dosage des composés phénoliques d' <i>Euphorbia guyoniana</i> Boiss. & Reut	78
06	Dosage des polyphénols totaux des extraits d' <i>Euphorbia guyoniana</i> Boiss. & Reut.	79
07	Dosage des flavonoïdes des extraits d' <i>Euphorbia guyoniana</i> Boiss. & Reut.	79
08	Dosage des acides-phénols des extraits d' <i>Euphorbia guyoniana</i> Boiss. & Reut.	79
09	Réactifs chimique utilisé pour l'activité antioxydant d' <i>Euphorbia guyoniana</i> Boiss. & Reut	80
10	Teste ABTS des extraits d' <i>Euphorbia guyoniana</i> Boiss. & Reut	80
11	Teste DPPH des extraits d' <i>Euphorbia guyoniana</i> Boiss. & Reut	81
12	Méthode de diffusion en disque sur milieu gélosé Müller Hinton.	82

Tables des matières

Remerciements	
Dédicace 1	
Dédicace 2	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Liste des annexes	
Introduction	2
<u>Chapitre I-Matériel et méthodes</u>	
I.1 Matériel	10
I.1.1. Matériel végétal	16
I.1.2. Choix de l'espèce	17
I.1.3. Systématique et description botanique et réparations géographique	11
I.1.4. Toxicité d' <i>Euphorbia guyoniana</i> Boiss. & Reut	16
I.1.5. Récolte	17
I.1.6. Séchage et broyage	17
I.2. Souches bactériennes.....	17
I.3. Méthodes	18
I.3.1. Extraction solide-liquide	18
I.3.2. Détermination de rendement d'extraction	19
I.3.3. Criblage phytochimique	19
I.2.4. Quantification des composés phénolique	22
I.3.4.1. Dosage des polyphénols totaux	22

I.3.4.2. Dosage des flavonoïdes	23
I.3.4.3. Dosage des acides phénols	23
I.3.5. Evaluation des activités biologiques	23
I.3.5.1. Activité antioxydant	23
A. Test d'ABTS	24
B. Piégeage de radical DPPH	26
I.3.5.2. Activité antimicrobienne	28
I.4. Analyses statistiques.....	29

Chapitre II-Résultats et discussion

II.1. Rendement d'extraction	32
II.2. Analyse phytochimique	33
II.2.1 Criblage phytochimique.....	33
II.2.2. Quantification des composés phénoliques	36
II.2.2.1. Teneur en polyphénols totaux	37
II.2.2.2. Teneur en flavonoïdes	39
II.2.2.3. Teneur en acides phénols	41
II.3. Activités biologiques.....	43
II.3.1. Activité anti-oxydante	43
II.3.1.1. Inhibition de radical cation d'ABTS ⁺	44
II.3.1.2. Piégeage du radical DPPH	46
II.3.1.3. corrélation entre l'activité antioxydante et les teneurs en composés phénoliques	50
II.3.2. Activité antibactérienne	51
Conclusion	55

Références bibliographiques	58
Annexes	69

Introduction

Introduction

L'utilisation thérapeutique des vertus extraordinaires des plantes fait partie intégrante des pratiques ancestrales. En effet, l'homme a longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques. A l'heure actuelle, les plantes demeurent encore une source précieuse de nourriture et de remèdes à laquelle fait appel une large couche des populations mondiales, notamment celles des pays en voie de développement (CORREIA *et al.*, 2006).

Bien qu'une grande partie du XX^{ème} siècle ait été consacrée à la mise au point de molécules de synthèse, la recherche de nouveaux agents bioactifs via le screening de sources naturelles n'a jamais été abandonnée (Correia *et al* 2006).

Les substances naturelles isolées à partir des végétaux ont montré des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie agroalimentaire, cosmétologique et pharmaceutique. La pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale. Aussi les recherches effectuées ont découvert des nouvelles molécules bioactives pour la synthèse et la semi-synthèse de ces molécules (Correia *et al* 2006).

Ces plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques (Zeghad, 2009). Ces métabolites sont couramment consommés quotidiennement sous forme de fruits, de légumes ou de boissons dérivés (Ghdira, 2005).

Le Sahara algérien connu pour son hostilité, dispose pourtant d'une grande diversité floristique. Cette richesse connaît une dégradation intense depuis quelques décennies. Les espèces évoluant dans ce milieu offrent généralement des molécules dotées d'activités biologiques intéressantes. Parmi ces composés, on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapeutique (Correia *et al* 2006).

Ces métabolites représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire (Herbert, 1989). Les métabolites secondaires sont classés en trois grands groupes, parmi lesquels, on cite les composés phénoliques, les terpènes et stéroïdes, et les composés azotés dont les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés,

qui possèdent une très large gamme d'activité biologique (Li, 2007). Les métabolites secondaires sont réputés par leurs activités biologiques nombreuses, comme antibactériennes, anticancéreuses, antifongiques, analgésiques, anti-inflammatoires, diurétiques, gastro-intestinales et antioxydantes (Harborne, 1998 ; Bruneton, 2009). La phytothérapie est souvent présentée comme une médecine naturelle. Toutefois, la phytothérapie n'a pas que des effets bénéfiques. Comme tout produit actif, elle peut avoir des effets indésirables, toxiques et allergiques (Aline, 2010).

Ces dernières décennies, l'utilisation des plantes médicinales a regain leur recours à cause des effets secondaires des médicaments conventionnels et l'émergence des nouvelles souches microbiennes multi-résistantes. En outre, le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du « stress oxydant », c'est-à-dire d'une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive des radicaux oxygénés toxiques. Actuellement, il est bien admis que même si un stress oxydant n'est pas une maladie, il est potentiellement impliqué dans de nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications lors de leur évolution, ce facteur d'inflammation et de mutagenèse est considéré comme une des principales causes de cancer et jouerait un rôle dans la maladie d'Alzheimer, comme dans plusieurs affections plus courantes telles que les maladies cardiovasculaires, les accidents cérébraux-vasculaires, l'arthrite rhumatoïde ou les cataractes (Bechlem, 2018).

Les antioxydants sont des molécules ou micro constituants capables d'interférer avec les radicaux libres. Ils agissent par le piégeage directement et spécifiquement des radicaux libres par des mécanismes de transfert d'électrons et de protons. Ils peuvent également chélater des ions de métaux de transition (Fe^{2+} , Cu^{+}) dont le rôle biologique est de promouvoir la production de radicaux libres. Les études actuelles ont montré que les extraits végétaux et les molécules qui en sont isolées, constituent la majorité de ces antioxydants (NèvLa). Les flavonoïdes constituent un large groupe de composés phénoliques distribués dans tout le règne végétal. En plus de leur possibilité d'utilisation comme marqueurs chimiotaxonomiques, ils sont connus pour leur large spectre d'activités biologiques. Ils sont utilisés notamment comme anti-inflammatoire, antiulcéreux, anticancéreux, antibactériens, etc. (Correia, 2006), mais la plus importante est leur activité anti-oxydante (Lhuillier, 2007).

Les flavonoïdes sont des composés actifs majeurs de nombreuses préparations médicales utilisées depuis des temps très anciens. La médecine moderne utilise de manière

croissante les flavonoïdes afin de traiter de nombreuses maladies, en utilisant leur capacité à inhiber spécifiquement certaines enzymes, pour stimuler certaines hormones ou neurotransmetteurs, et pour piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ($\text{OH}\cdot$) et superoxydes ($\text{O}\cdot 2^-$) (Havsteen, 2002).

De plus plusieurs études ont montré que les flavonoïdes sont dotés d'activités antiinflammatoires, cardioprotectrices, neuprotectrices, oestrogéniques et inhibitrices d'enzymes. En somme, les flavonoïdes sont d'un intérêt grandissant pour la santé humaine car ils favorisent, à travers leur consommation sous forme d'aliments qui doit être entre 50 et 800 mg par jour, tout dépend de la consommation des légumes et des fruits (Ameha, 2006).

Les infections bactériennes sont causées par différents micro-organismes de Gram + et Gram-, et sont la cause des maladies les plus fatales et des épidémies les plus répandues. La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. Cependant, la prescription à grande échelle de ces agents est parfois inappropriée outre leur utilisation abusive sont à l'origine de l'apparition de la multi-résistance bactérienne. D'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies, qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes (Billing et Sherman 1998).

L'usage des plantes, dites médicinales, constitue aujourd'hui une grande utilisation dans l'industrie pharmaceutique. C'est dans ce contexte, que nous envisageons de réaliser des essais antibactériens avec les extraits des espèces végétales sahariennes. Les résultats prévisibles permettront de valoriser ces espèces en vue d'une utilisation à une échelle plus industrielle. *Euphorbia guyoniana* est parmi les espèces sahariennes qui sont très utilisées traditionnellement dans le traitement des différentes maladies, en particulier celles dermatologiques. Cette espèce appartient à la famille des Euphorbiaceae Cette famille, avec ses 5000 à 10000 espèces regroupées dans près de 300 genres (Spichigera, 2000) est l'une des familles les plus vastes et les plus cosmopolites que compte le sous embranchement des Angiospermes. Paradoxalement, il s'agit de l'une des moins connue du point de vue systématique. Deux explications peuvent être apportées à cet état de fait : tout d'abord en raison de sa distribution, puisque principalement localisée en des zones tropicales, mais aussi en raison de l'existence de « fleurs minutes » chez certains de ses représentants ne facilitant évidemment en rien toute étude botanique (Webster, 1987).

Cependant, depuis un siècle et demi, quelques systématiciens se sont penchés et se penchent encore sur la classification de cette grande famille. En effet, la classification botanique, loin d'être statique, est une discipline en perpétuelle évolution. De nombreux travaux, intégrant un nombre toujours plus important de caractères tant morphologiques qu'anatomiques, conduiront à la création de nouveaux systèmes de classifications, ainsi qu'aux remaniements de certains d'entre eux. Jusqu'à ces vingt dernières années, aucune de ces modifications n'a eu de répercussions directes sur la famille des Euphorbiaceae en ce sens que l'ensemble des auteurs se sont toujours accordés à penser que la principale famille, représentative de l'ordre des Euphorbiales (Malpighiales), définie par Lindley en 1833, restait les Euphorbiaceae (Webster, 1987). Les modifications apportées aux différents systèmes de classifications ne l'étaient véritablement qu'en amont de l'ordre des Euphorbiales (Spichigera, 2000).

Ainsi, pour Engler (1896), la famille des Euphorbiaceae appartenait aux Spermaphytes, Angiospermes, Dicotylédones, Dialypétales, Thalamiflores et à l'ordre des Géraniales, sous ordre des Euphorbiaceae. Cronquist (1981), situait la famille des Euphorbiaceae dans le super-ordre des Rosidae et l'ordre des Euphorbiales. Dahlgren (1989), pour sa part, classait cette même famille dans le super-ordre des Malviflorae et l'ordre des Euphorbiales. Thorne (1992) proposait, quant à lui une classification situant les Euphorbiaceae dans le super-ordre des Malvanae et l'ordre des Euphorbiales (Nève, 2002).

De nombreuses études phylogénétiques conduisent à une dichotomie en marge de la division « classique » avec non plus les deux grandes classes précédemment citées, mais les angiospermes monoaperturés et les angiospermes supérieures ou Eudicotylédones un groupe de chercheurs travaillant à l'élaboration d'un système de classifications phylogénétiques moléculaires, dénommé Angiosperm Phylogeny Group (APG), a publié, en 1998, une nouvelle classification, totalement novatrice, intégrant l'ensemble de ces données que nous nous proposons de retenir. Ainsi, les Euphorbiaceae appartiennent aux Angiospermes supérieurs ou Eudicotylédones, à l'ordre des Rosidaes, Rosidaes hypogynes, Gamacarpellées, discifères ou Glandulifères, à feuilles généralement simples, entières (Eurosides I), ordre des Malpighiales, Considérant à l'origine polygénétique des Euphorbiaceae, leur distribution cosmopolite et leur grande diversité tant botanique que chimique, il n'est pas surprenant de constater que cette famille offrait et offre encore une grande quantité de plantes d'intérêt économique avec notamment (Schultes, 1987).

- Des plantes oléagineuses,
- Des plantes alimentaires,
- Des plantes fournissant du bois,
- Des plantes fournissant du papier,
- Des plantes à fibres,
- Des plantes fournissant des poisons.

A l'heure actuelle, un nombre de ces plantes jouent encore un rôle prépondérant dans la société (Spichigera, 2000 ; Shultes, 1987).

La famille des Euphorbiaceae est connue pour être cosmopolite et d'une grande diversité tant sur le plan botanique que chimique. Elle offre plusieurs plantes d'intérêt économique, et d'autres largement utilisées en médecine traditionnelle. Parmi les espèces représentant cette famille dans le Sahara algérien, *Euphorbia guyoniana* (Ahmad et al 2006 ; Haba, 2007 et 2009). Les travaux réalisés sont localisés dans les régions de Ouargla et Ghardaia (Maiza et al, 1993 ; Chhabra, 1994 ; Hernández, 2003 ; Ould El Hadj et al, 2003 ; Manga et al 2004 ; Haba, 2008 ; Chehma et Djebbar, 2008 et plus récemment Hadjaiji et Derridj, 2013 et Kemmassi et al, 2014).

La majorité des Euphorbes sont connues par leur noms vernaculaires «bouhliba», qui signifie plante à sève laiteuse (Bellakhdar, 1997), car les euphorbes contiennent un suc laiteux (liquide blanc) collant et irritant appelée latex. Ce latex provoque des irritations pour les peaux sensibles, et il est capable de provoquer des grave dégâts des muqueuses buccales et digestives, et qui peut causer, au contact des yeux, une cécité temporaire (Könemann, 1997 ; Bruneton, 1999). Les Euphorbes ont de multiples utilisations, à titre médicinal, elles sont employées comme purgatif ou vésicant, contre les parasites intestinaux, l'asthme, les bronchites chroniques, la migraine (Chabbi et al 2007), pour traiter les morsures de serpent, dans le traitement de la dysenterie, du choléra, et de syphilis. Le latex des euphorbes est parfois employé pour pêcher en le jetant dans l'eau pour empoisonner les poissons. Il a été aussi exploité pour produire du caoutchouc (Karharo, 1974). L'*Euphorbia* vient du nom

Euphorbos le médecin du roi Juba II de Mauritanie au 1er siècle avant Jésus Christ, et conservé par Linné (Jassbi, 2006).

Les Euphorbes sont des plantes herbacées, arbustes et de nombreuses plantes succulentes ressemblent à première vue à des cactées. Les tiges très courtes, couchées, très ramifiées, étalées en cercle sur le sol. Feuilles simples et opposées, rarement stipulées. Fleurs de ce genre ont une structure quasiment identique, se limitant à un stigmate et une étamine, toujours vert vif et paraissent généralement en petits bouquets, cyathe très petites (moins de 2mm), constitué par une fleur femelle centrale et cinq cymes exigües de fleurs males, réduites en général à une étamine, le tout enveloppé dans un involucre cupuliforme à 4-5 lobes présentant une glande charnue de forme variable. Carpelles soudés en ovaire supère à 3 loges uniovulées. Capsule tricoque, très généralement déhiscente (Quezel, 1962 ; Könemann, 1997). Fruit (schizocarpe) capsule tricoque explosif. Les graines quadrangulaires, pourtant de petits tubercules et dépourvues de caroncule (Florence, 1997).

L'espèce *Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut. ou *Euphorbia guyonianus tithymalus* (*Euphorbia guyoniana* Boissier & Reuter) Klotzsch & Garcke est une espèce endémique d'Algérie, localisée dans les régions sableuses, prédésertique et dans le Sahara septentrional. *Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut. est connue par son nom vernaculaire *lebbina* a fait l'objet de deux études phytochimiques antérieures. La première réalisée sur les parties aériennes a conduit à l'isolement et la caractérisation de deux diterpènes polyesters à squelette j'atrophie alors que la seconde menée sur les racines s'est soldée par l'isolement et l'identification de nombreux diterpènes et triterpènes de squelettes carbonés divers La composition des extraits polaires de cette espèce reste cependant inconnue.

Euphorbia guyoniana est une plante qui se développe sur les Terrains ensablés du désert (Quezel et Santa, 1963). Le genre *Euphorbia* est le plus représentatif de la famille des Euphorbiacées (Ozenda, 1991). Ces plantes sont connues pour la présence de latex qui possède un effet irritant sur les yeux et la peau (Bellakhdar, 1997). Elles ont été utilisées dans la médecine traditionnelle pour traiter les maladies de la peau, les migraines, les parasites et les verrues intestinales (Singla et Pathak, 1990). En outre, les plantes de ce genre sont connues pour leur importante teneur en métabolites secondaires. La présence de types particuliers de diterpènes (Shi et al., 2005), des dérivés macrocycliques, polycycliques (Redei et al., 2003) et aromatiques (Oksuz et al., 2002), triterpènes (Lima et al., 2003), des stéroïdes (Tanaka et al., 1999), des composés alcaloïdes et des flavonoïdes (Boudiar et al., 2010),

expliquent les activités biologiques de ce genre, notamment antitumorale, antivirale, différents effets vasculaires et des propriétés cytotoxiques (Appendino et al., 2002 ; Heba et al, 2007; Hohmann et al, 2001). Deux nouveaux polyesters de diterpène avec jatrophone ont été isolés à partir des parties aériennes de *E. guyoniana* (Ahmed et al., 2006, Kúsz et al, 2016). Ils sont considérés comme des inhibiteurs puissants (Corea et al., 2003; Jassbi, 2006). Ces composés présentent une cytotoxicité contre les cellules human embryonic kidney 293 61 (HEK293) avec des valeurs IC50 de 35-100 uM (Hegazy et al., 2010). Selon Le Floc'h (1983), le latex de cette plante est utilisé pour soigner les morsures de vipères et les piqûres de scorpions.

Dans ce contexte et dans l'objectif de contribuer à la valorisation des plantes poussant dans notre Sahara, nous nous sommes proposé d'étudier les extraits issus des parties aériennes de l'espèce *guyoniana tithymalus* (*Euphorbia guyoniana* Boissier). Notre choix s'est porté sur cette espèce à cause de ses nombreux usages en médecine traditionnelle et parce qu'elle n'a été que peu étudiée sur les plans phytochimique et pharmacologique.

Le présent travail a pour principal objectif de réaliser une étude sur la composition phytochimique et les activités biologiques des extraits de différentes polarités d'*Euphorbia guyoniana*.

Chapitre I-Matériel et méthodes

Chapitre I-Matériel et méthodes

Le présent travail est effectué au niveau de laboratoire de Biochimie au niveau de Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Vie et de la Nature à l'Université Kasdi Merbah Ouargla et au niveau de centre de recherche et d'analyse physique et chimique (CRAPC) Ouargla.

I.1 Matériel

I.1.1. Matériel végétal

I.1.2. Choix de l'espèce

La flore du Sahara regroupe environ 500 taxons de plantes supérieures (OZENDA, 1983), dont une partie reste, de nos jours, utilisée par les autochtones comme plantes médicinales (MAIRE, 1933). Le règne végétal est soumis à une agression constante par les phytophages, pour cela, et afin prémunir contre les intermittentes attaques des herbivores, des adaptations morphologiques, anatomiques et physiologiques divers sont constatées. La capacité que possèdent les plantes de se protéger contre leurs ennemis naturels a été réexaminée en détail depuis des siècles en vue d'être exploitée à des fins agronomiques (VERSCHAFFCLT, 1910). *Euphorbia guyoniana* est parmi les espèces connue et utilisée par la population locale afin de traiter différents problèmes de la santé, L'utilisation des Euphorbiacées est quasi-mondiale, principalement dans le traitement de plusieurs affections telles que les maladies gastro-intestinales et la migraine (SINGLA et PATHAK, 1990). Certaines de leurs espèces possèdent également des propriétés cicatrisantes, antibactériennes, antifongiques, anti-inflammatoires, antihelminthiques, hémostatiques, purgatifs et contraceptifs (HERNANDEZ *et al.*, 2003 ; MAVAR *et al.*, 2004 ; LI *et al.*, 2008), anti-tumoral (NORHANOM et YADAV, 1995), cytotoxique (AL-FATIMI, 2005)

En Algérie, l'espèce *Euphorbia guyoniana* est utilisée en pharmacopée par de nombreuses populations sahariennes contre les morsures de serpents. Le latex de la plante est utilisé pour attaquer les verrues et pour extirper les épines. On l'applique également sur les morsures et les piqûres venimeuses (BELLAKHDAR, 1997).

I.1.3. Systématique et description botanique et répartition géographique

D'après les classifications botaniques classiques, les Euphorbiaceae sont classées dans les et l'espèce *Euphorbia guyoniana* est classée de l'ordre suivant :

Classification d'*Euphorbia guyoniana* (Site web 1)

Règne	Plantae
Embranchement	Tracheophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Malpighiales
Famille	Euphorbiaceae
Genre	<i>Euphorbia</i>
Espèce	<i>Euphorbia guyoniana</i> Boiss. & Reut.

Selon la dernière classification, l'espèce est appelée *Euphorbia guyoniana tithymalus* (*Euphorbia guyoniana* Boissier et Reuter) Klotzsch & Garcke (SMARA, 2014).

La majorité des *Euphorbes* sont connues par leur noms vernaculaires « Bouhliba » qui signifie plante à sève laiteuse, car les Euphorbes contiennent un suc laiteux (liquide blanc) collant et irritant appelée latex. L'espèce *E. guyoniana* est aussi connue sous ses noms vernaculaires : Lebbina (Ghardaia), Oum El L'bina (Adrar), Moulbina et Ammaia (Béni Abbés et El Goléa) (QUENZEL et SANTA, 1963 ; OZENDA, 1983 ; ADJANOHOUN *et al.*, 1989 ; MAIZA *et al.*, 1992 ; CHEHMA, 2006).

Euphorbia guyoniana tithymalus (*Euphorbia guyoniana* Boissier & Reuter) est une espèce commune dans tout le Sahara septentrional et la région pré-désertique au sud jusqu'à EL Golea et à Tademaït. Elle est observée en pieds isolés et en petits groupes dans les zones ensablées et a été répertoriée également dans le sable de l'étage tropical (MAIRE, 1933; OZENDA, 1991).

En milieu dunaire, cette espèce tend à envahir les petites formations dunaires des zones désertiques. Au dessèchement de toute la partie aérienne, la reprise de la croissance se fait durant la saison suivante, à partir des bourgeons enterrés dans le sol. Au niveau écologique, *Euphorbia guyoniana*, est une espèce strictement désertique. Son apparition indique là où elle existe un climat méditerranéen saharien. Comme pour le reste des espèces du genre *Euphorbia*, elle ne présente aucun intérêt pastoral (RAUNKIAER, 1934).

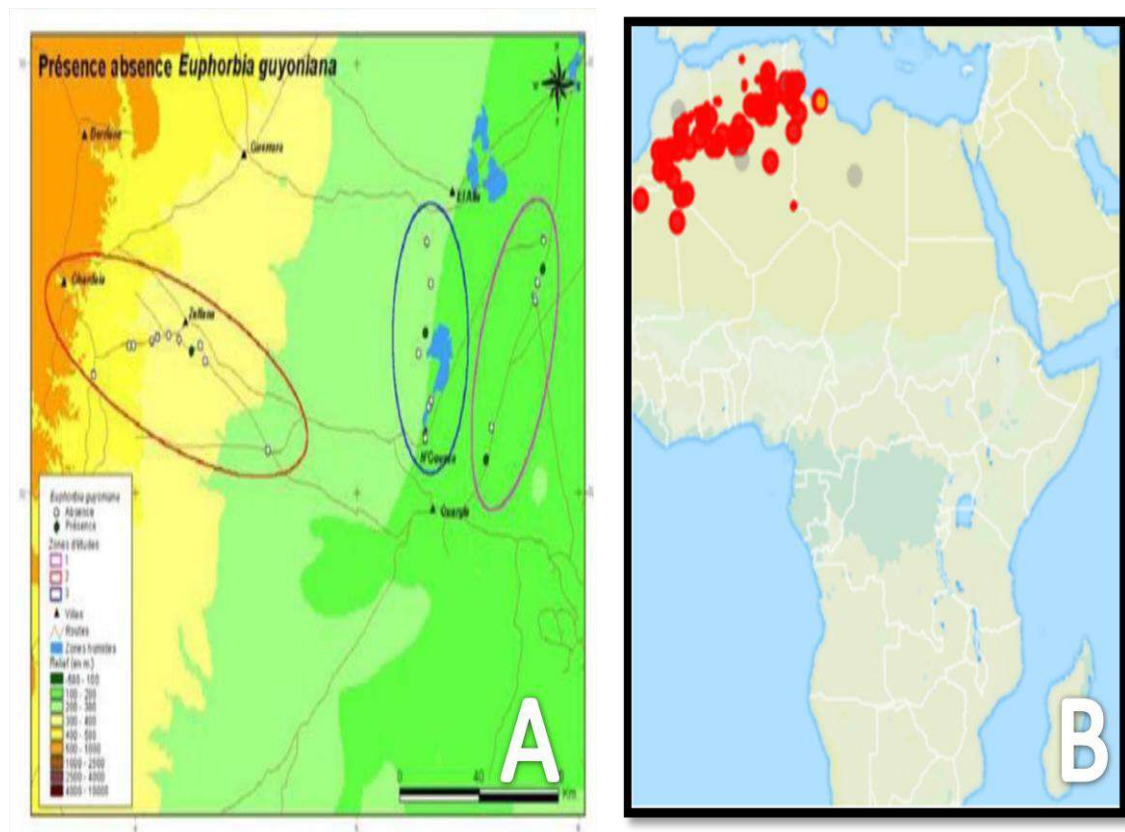


Figure 01 : Cartes de répartition géographique d'*Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut.

(A) Présence et absence en Algérie (HABA *et al.*, 2008).

(B) Au Sahara selon africain plantes (site web 2).

Euphorbia guyoniana est une plante spontanée (OUELD EL HADJ *et al.*, 2003 ; CHEHMA et DJEBAR, 2008 ; HADJAJI et DERRIDJ, 2013). c'est espèce végétale laticifère de la famille des *Euphorbiaceae*, (KEMASSI *et al.*, 2015) endémique à l'Algérie, hémicryptophyte et d'un vert foncé. Elle peut être observée en pieds, isolés et en petits

groupes. Elle est laticifère et relativement touffue, possédant un système racinaire très développé, pénétrant profondément dans le sol (GUBB, 1913; OZENDA, 1991).

Cette espèce a une racine pivot principale qui s'enfonce droit dans le sol et éventuellement une ou des racines horizontales qui permettent à un pied mère d'engendrer des pieds filles (SMARA, 2014).

Il s'agit d'une plante puissante à souche souterraine, longuement traçante, et dont le système racinaire est très bien ramifié, traçant et souvent très superficiel. Les tiges élancées et dressées sont très ramifiées dès la base de (30 à 100 cm de haut). Elles contiennent du latex, et peuvent atteindre jusqu'à 1 m de hauteur, notamment dans les situations dunaires, bien arrosées par les eaux de ruissellement (GUBB, 1913; OZENDA, 1991) (fig.2).



Figure 02 : *Euphorbia guyoniana* (Boiss. & Reut.) Au stade floraison (BEGAA, 2019) (Site web 3)

Les feuilles sont très petites, linéaires et alternes, se desséchant rapidement. Ils sont très peu nombreuses, parfois absentes surtout sur les rameaux fleuris (GUBB, 1913; OZENDA, 1991) (fig.3).



Figure 03 : Les feuillets d'*euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut.
(site web 4)

La floraison s'effectue en hiver (janvier-février) et parfois au printemps. Les fleurs, appelées cyathes sont de couleur jaunâtre et de taille réduite (GUBB, 1913; OZENDA, 1991).

Une tige terminale se finit par deux petites feuilles opposées au centre desquelles pousse une cyathe. Cette cyathe est entourée par quatre glandes jaunes qui proviennent de la fusion des bractées. La cyathe est en fait une ombelle de fleurs, Il y a une unique fleur femelle, portée par un pédoncule; son ovaire volumineux a la taille d'un petit pois ; il est divisé en trois loges contenant chacune une graine ; il est surmonté de trois styles soudés à leur base et de trois stigmates qui ont servi à capter le pollen et à féconder l'ovaire (fig.4) (site web 1)



Figure 04 : Fleur et ovaire d'*euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut.(TAOUS, 2018).
(Site web3)

Les graines sont sans caroncule, noirâtres et munies de côtes longitudinales grises, glandes du cyathe arrondies sans pointe Le fruit est une capsule de 4 à 5 mm, contenant des graines ailées (GUBB, 1913; OZENDA, 1991).

Lorsque les graines murissent, toutes les parties des cyathes disparaissent ; il ne reste que les fruits au bout des tiges (OUZINA.2018) (fig.5).



Figure 05 : fruit d'*Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut (OUZINA,2018).
(Site web 3)

I.1.4. Toxicité d'*Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut.

Le latex d'*Euphorbia guyoniana* provoque des rougeurs, sur la peau, des érythèmes ou des phlyctènes. Ce latex très irritant pour les yeux entraînant, par simple contact, même fugitif, des larmoiements intenses, une augmentation de la pression intraoculaire et de la photophobie. A des doses plus élevées, interviennent des lésions graves de l'œil pouvant aller jusqu'à la cécité. Le contact direct n'est pas nécessaire pour provoquer une irritation des yeux car le principe d'irritation du latex est un effet volatil. Les troubles de la vue sont accompagnés généralement de toux de rhinite des écoulements nasals de laryngite et de brûlure de lèvres. Une fois absorbé, le latex entraîne des symptômes plus ou moins sévères de gastro-entérite et d'inflammation des muqueuses du tube digestif (BELLAKHDAR, 1997).

I.1.5. Récolte

La partie aérienne d'*Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut. est récoltée le mois de Mars 2018 dans la région de Oued N'sa à Guerrara, wilaya de Ghardaïa. L'identification botanique de l'espèce a été réalisée en utilisant « Flore et végétation du Sahara » (OZENDA, 2004). Durant la récolte, la prise des gants est obligatoire afin d'éviter le contact direct de la peau avec le latex.

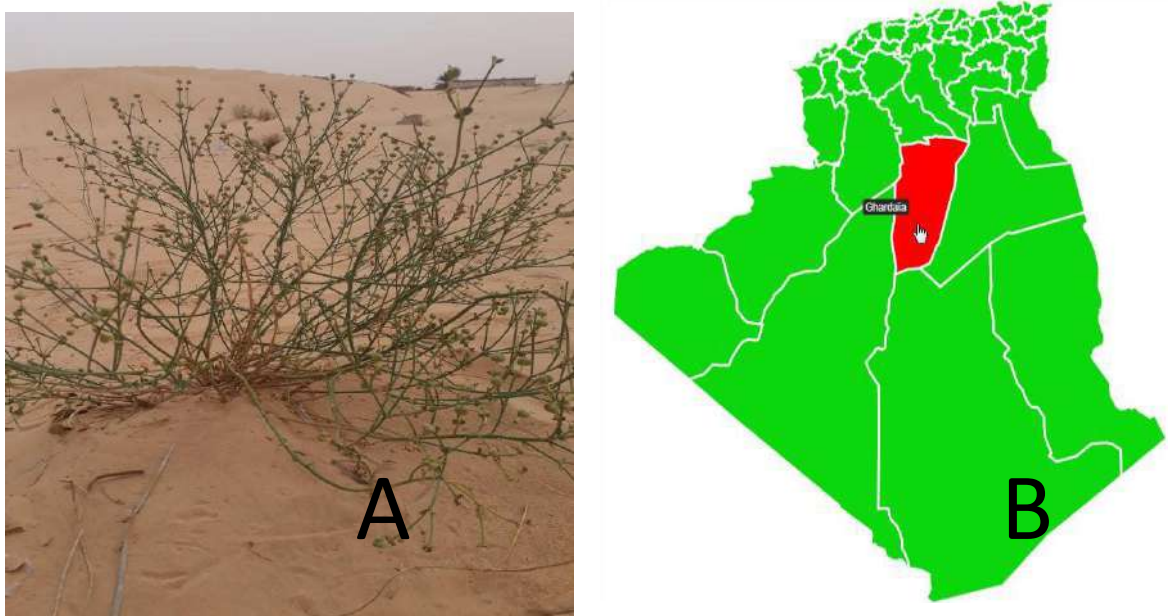


Figure 06 : *Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut

A : L'espèce dans son écotope

B : La zone de la récolte (Site web 5)

I.1.6. Séchage et broyage

Après la récolte, la partie aérienne d'*Euphorbia guyoniana* est bien rincée avec de l'eau de robinet et séchée avec de papiers absorbants, puis la partie aérienne est séchée dans un endroit bien aéré à la température ambiante et à l'abri de lumière entre 3 à 4 semaines. La partie aérienne sèche est broyée par un broyeur électrique et la poudre du matériel végétal est conservée dans des flacons en verre jusqu'à son utilisation.

I.2. Souches bactériennes

L'activité antibactérienne été évalué sur différents microorganismes. Les cinq souches bactériennes utilisées sont (*E. coli*, *pasturella sp*) la source de l'hôpital MOHAMMED BOUDIAF à OUARGLA. (*lysteria monocytogene* (ATCC 13932), *pseudomonas aerogenosa*

(ATCC 9027)) et *micrococcus luteus* (ATCC 9314) la source Me. BOURICHA à UNIVERSITE KASDI MERBAH – OUARGLA. choisies au cours de cette étude sont à l'origine de plusieurs infections (urinaire, intestinale, respiratoire, etc.). Elles sont entretenues par repiquage sur gélose nutritive favorable à leur croissance pendant 24h, à l'obscurité et à 37°C.

I.3. Méthodes

I.3.1. Extraction solide-liquide

L'extraction des principes actifs d'*Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut. Est effectuée par macération en utilisant trois solvants : le méthanol, chloroforme et dichlorométhane.

Un poids de 10 g de la poudre végétale de la partie aérienne est mélangé avec 100 ml des solvants pendant 24 heures à la température ambiante. Le mélange est filtré à l'aide d'un papier filtre Wattman N° 1. Cette opération est répétée 3 fois afin d'épuiser le matériel végétal. L'extrait obtenu est ensuite concentré par le rotavapor (Rotavapor Heidolph.Laborota 4000 efficient) à 40 °C. Les résidus secs obtenus après évaporation des solvants (méthanol, chloroforme, dichlorométhane) sont solubilisés dans un système de solvants : l'eau distillée et DMSO (5%). Les extraits concentrés sont conservés dans des tubes à eppendorf de 1,5 ml à +4 °C jusqu'à son utilisation.



Figure 07 : Différents extraits d'*Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut (ALI et BELTAYEB, 2021).

I.3.2. Détermination de rendement d'extraction

Les rendements d'extraction correspondent au pourcentage du principe actif dissout dans le solvant organique utilisé pour l'extraction par rapport au poids du végétal utilisé pour l'extraction (KEMASSI, 2014).

Le poids de l'extrait sec est déterminé par la différence entre le poids du ballon plein (après évaporation) et le poids du ballon vide (avant évaporation) (MOHAMMEDI, 2006). Cette méthode est appliquée pour les trois solvants.

Pour calculer le rendement la formule suivante est utilisée (FOLO LISELE, 2014) :

$$RD = (P1 - P2) / E * 100$$

Rd : Rendement d'extraction.

P1: le poids du ballon plein (après Évaporation).

P2: poids du ballon vide (avant évaporation).

E: Poids de la poudre de matériel végétal utilisée pour l'extraction.

I.3.3. Criblage phytochimique

Criblage phytochimique de la plante étudiée a pour objectif de rechercher les substances bioactives, en utilisant une série de méthodes colorimétriques (BOUMAZA S, 2018).

Le criblage phytochimique est une analyse qualitative basée sur des réactions de précipitations et/ou de colorations ainsi qu'à des examens en lumière ultraviolette. Ils sont effectués sur les extraits (MeOH, CF, DCM) d'*Euphorbia guyoniana* Boiss & Reut. pour mettre en évidence la présence des différents métabolites plusieurs méthodes sont adoptées.

Les métabolites recherchés sont :

a. Tanins

Le test de chlorure de fer est utilisé pour la détection de présence des tanins. Le test consiste à mélanger 2 ml d'extrait avec quelques gouttes d'une solution de FeCl₃ (1%). Le mélange est incubé pendant 15 min à 50°C. La présence des tanins est indiquée par une coloration verdâtre ou bleu-noir (TREASE et EVANS, 1987).

La différenciation des tanins (cathéchiques et galliques) est obtenue grâce au réactif de Stiasny (10 ml de formol (35%) + 5ml d'acide chlorhydrique).

Sur 30 ml d'extrait aqueux on ajoute 15 ml de réactif de Stiasny, ensuite la solution est chauffée à reflux au bain marie pendant 15 à 30 minutes. L'apparition d'un précipité de couleur rose claire montre la présence des tanins catéchiques (MIBINDZOU MOUELLET, 2004).

b. Flavonoïdes

b1. Anthocyanes

À 2 ml d'extrait aqueux on ajoute 2 ml d'HCl (2N) puis 2 ml d'hydroxyde d'ammonium (NH₄OH). Une coloration rouge en milieu acide et bleue violacée en milieu basique témoigne de la présence d'anthocyanes (RIBEREAU-GAYON, 1968).

b2. Réaction à la cyanidine

À 5 ml d'extrait aqueux, on ajoute 5 ml d'éthanol chlorhydrique (éthanol à 95°, eau distillée et acide chlorhydrique en volumes égales de 5 ml) ensuite quelques copeaux de magnésium sont ajoutés ainsi qu'un ml d'alcool isoamylique. L'apparition d'une coloration sur la couche surnageant d'alcool isoamylique indique la présence des flavonoïdes libres (génine) :

- Une coloration rose-orangée indique la présence des flavones.
- Une coloration rose-violacée indique la présence des flavanones.
- Une coloration rouge indique la présence des flavonols et des flavanonols.

La réaction de la cyanidine est effectuée sans ajouter des copeaux de magnésium et chauffée pendant 10 minutes au bain-marie. En présence de leucoanthocyanes, il se développe une coloration rouge cerise ou violacée ; les catéchols donnent une teinte brune-rouge (MIBINDZOU MOUELLET, 2004).

c. Coumarines

Les coumarines sont révélées à partir de 2 ml de l'infusé à 5% placé dans un tube dans lequel sont ajoutés 3 ml de NaOH (10%). Après agitation de la solution, l'apparition d'une couleur jaune indique la présence de coumarines (DIALLO, 2000).

d. Quinones libres

A un volume de 5 ml d'extrait sont ajoutées quelques gouttes de NaOH (1%) développent une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet, révèle la présence des quinones libres (DOHOU, 2004).

e. Alcaloïdes

Un volume de 5 ml d'acide chlorhydrique à 1% sont ajoutés à 1 ml de chaque extrait, le mélange est chauffé au bain marie puis chaque extrait est divisé en deux volumes égaux.

Un volume est traité par 5 gouttes de réactif de Mayer (1,36 g HgCl ; 5 g KI ; eau distillée q.s.p 100 ml), l'autre par 5 gouttes de réactif de Wagner (2g KI ; 1,27 g d'iode ; eau distillée q.s.p 100 ml). La formation d'un précipité blanc ou brun révèle la présence des alcaloïdes (BENZAHI, 2001 ; CHAOUCH, 2001).

f. Terpénoïdes

Deux méthodes ont été utilisées pour détecter la présence des terpénoïdes:

- Test de Libermann-Burchard : A 5 ml d'extrait on ajoute 2 ml d'anhydride acétique et 1 ml d'acide sulfurique. L'apparition d'une couleur mauve ou violette indique un test positif.
- 5 ml d'extrait est ajouté à 2 ml de Chloroforme et 3 ml d'acide sulfurique concentré.

La formation de deux phases et une couleur marron à l'interphase indique la présence de terpénoïdes.

g. Saponosides : test de mousse

Dans un tube à essai, 10 ml de l'extrait aqueux est agité énergétiquement pendant 15 secondes puis laissé au repos pendant 15 min. Une hauteur de mousse persistante supérieur à 1 cm indique la présence de saponosides (DOHOU *et al.*, 2003).

h. Stéroïdes

Dans une capsule, on introduit 5 ml d'anhydride acétique à 5 ml de l'extrait, qui sont repris dans un tube à essai dans lequel sont ajoutés 0,5 ml de H₂SO₄ concentré. L'apparition d'une coloration violette qui vire au bleu puis au vert indique une réaction positive (HARBORNE, 1998).

i. Composés réducteurs

Leur détection consiste à traiter 1 ml de l'extrait avec 2 ml d'eau distillée et 2 ml de la liqueur de Fehling puis les tubes sont chauffés au bain marie à 40°C. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge-brique (TREASE et EVANS, 1987).

I.2.4. Quantification des composés phénolique

Le but de ces tests est la mise en évidence des polyphénols totaux et flavonoïdes, acides phénols présents dans les trois extraits obtenues à partir de la partie aérienne d'*Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut par des méthodes colorimétriques.

I.3.4.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été fait par la méthode de Folin-Ciocalteu décrite par SINGLETON et ROSSI (1965). Ce dosage est basé sur la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans l'extrait (SINGLETON et ROSSI, 1965). Chaque extrait (40 µl) ou l'acide gallique (0800µg/ml) est mélangé avec 1,8 ml de réactif Folin-Ciocalteu (dilué 10 fois avec de l'eau distillée). Après un repos de 5 min, 1,2 ml de la solution de Na₂CO₃ (7,5 %) est ajouté au mélange. Après une homogénéisation vigoureuse puis un repos de 60 min à l'obscurité, à température ambiante, l'absorbance est

mesuré à 765 nm par un spectrophotomètre UV-Visible. Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique EAG/g de poids sec (PS) de matériel végétal (SHUI et LEONG, 2006).

I.3.4.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode colorimétrique de KIM *et al* (2003). Un volume de 1 ml de l'extrait est dilué avec 4 ml de l'eau distillée. Ensuite, 0,3 ml de solution de nitrite de sodium NaNO₂ (5%) est ajouté. Après 5 min, 0,3 ml de solution de chlorure d'aluminium AlCl₃ (10%) est ajouté. Le mélange est laissé au repos pendant 5 min, puis 2 ml de solution d'hydroxyde de sodium NaOH (1 M) sont additionnés. Le volume de ce mélange est complété à 10 ml avec de l'eau distillée. Après agitation, l'absorbance est mesurée immédiatement à 510 nm un spectrophotomètre UV Visible. La gamme étalon est préparée avec la rutine (0,05-0,5 mg/ml) et les résultats sont exprimés en mg équivalent de rutine ER/g de poids sec de matériel végétal.

I.3.4.3. Dosage des acides phénols

L'estimation des acides-phénols est effectuée selon la méthode d'Arnov (SZAUFER HADJRYCH, 2004). Un volume de 1 ml d'échantillon est mélangé à 5 ml de l'eau distillée, puis 1 ml d'HCl (0,5 M), 1 ml de réactif d'Arnov (solution aqueuse de molybdate de sodium 10 (p/v) et nitrite de sodium 10% (p/v)) et 1 ml d'hydroxyde de sodium (1 M) ont été additionnés. Le volume du mélange réactionnel est complété à 10 ml avec de l'eau distillée. La lecture de l'absorbance est faite à 490 nm par un spectrophotomètre UV Visible. L'acide caféique a été utilisé comme référence pour la préparation de la courbe d'étalonnage avec des concentrations allant de 0 à 200 µg/ml. Les résultats sont exprimés en µg équivalent d'acide caféique EAC/g de poids sec de matériel végétal.

I.3.5. Evaluation des activités biologiques

I.3.5.1. Activité antioxydant

Le terme « antioxydant » a été formulé « comme une substance qui en faibles concentrations, en présence du substrat oxydable, ralentit ou empêche significativement l'oxydation des substrats matériels » (ABUDUNIA, 2018). Vansant définit les antioxydants comme substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux

libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques de ROS (Reactive oxygen species) (VANSANT, 2004).

Les antioxydants peuvent réduire les radicaux primaires par 2 mécanismes :

- Par transfert d'électron singlet.
- Ou par transfert d'atome d'hydrogène (SMARA O, 2014).

A. Test d'ABTS

C'est une méthode colorimétrique qui se base sur un essai de décoloration est rapportée afin de détecter le pouvoir anti radicalaire d'un composé donné. Le radical cation préforme 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) ou $ABTS^{•+}$ est généré par l'oxydation de la molécule stable d'ABTS avec le persulfate de potassium (RE *et al.*, 1999). La formation de radical cation $ABTS^{•+}$ se traduit par l'apparition d'une coloration vert bleu intense. En présence d'un donneur de $H^•$, le passage du radical cation $ABTS^{•+}$ a la forme non radicalaire s'accompagne de la disparition de cette coloration mesurée spectrophotométriquement à une longueur d'onde de 734 nm. Cette décoloration résulte d'une réaction entre le radical $ABTS^{•+}$ et un donneur de $H^•$ (HADJ SALEM, 2009).

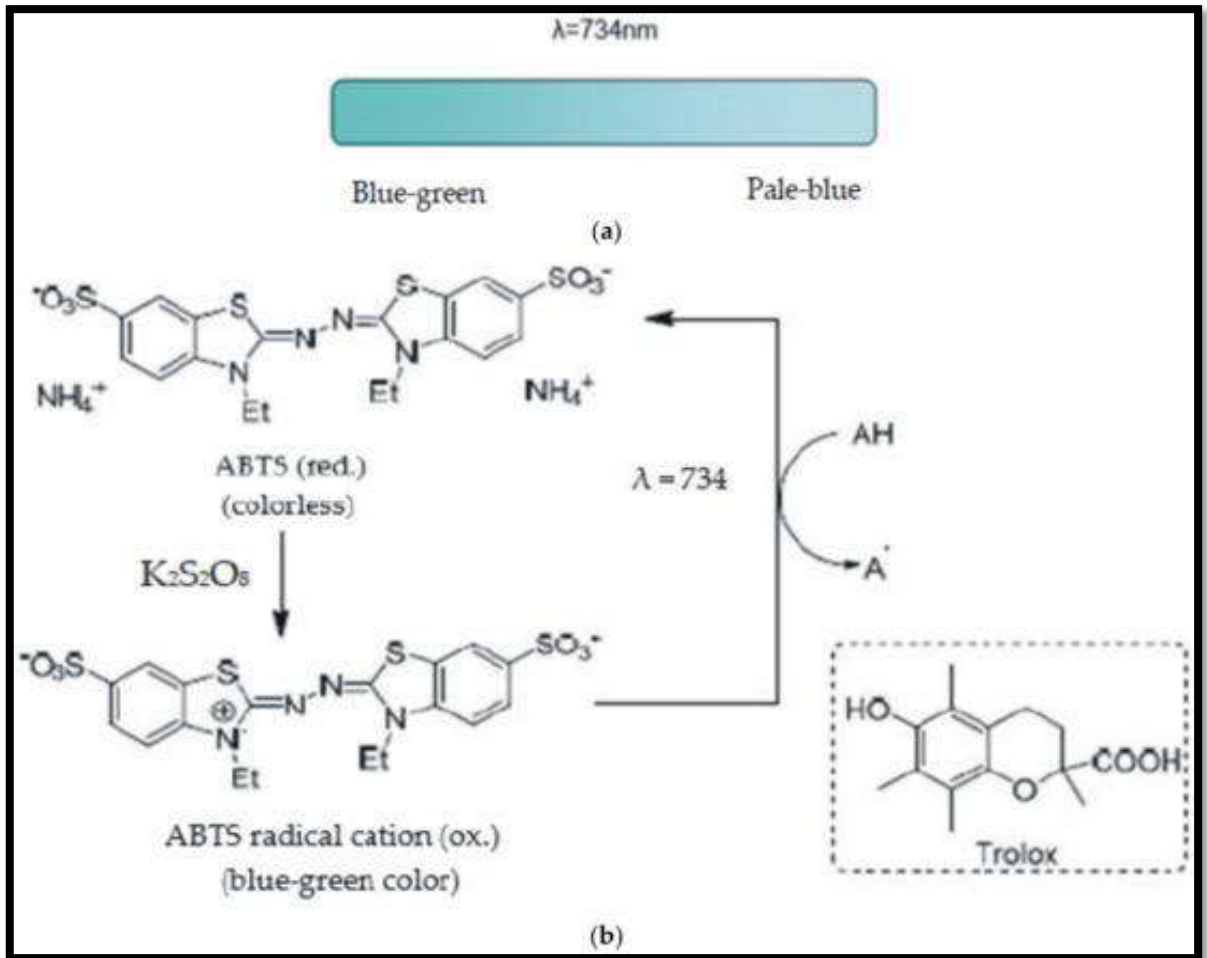


Figure08 : Schéma présente le principe de test ABTS (MILLER *et al.*, 1993)

(a) Variation de couleur dans le test ABTS

(b) Schéma de réaction impliqué dans le dosage de l'activité de piégeage des radicaux Azinobis- (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS)

Le protocole:

La solution de radical d'ABTS $^{•+}$ est préparée par la réaction entre une solution d'ABTS (7 mM) et une solution de persulfate de potassium $K_2S_2O_8$ (2,45 mM) incubées à 23 °C pendant 12 à 16 heures, à l'obscurité. La solution d'ABTS $^{•+}$ est diluée avec l'éthanol (80%) jusqu'à l'obtention d'une absorbance égale à $0,700 \pm 0,020$ à 734 nm (CAI *et al.*, 2004). Un volume de 3,9 ml de cette solution est mélangé avec 0,1 ml de l'échantillon testé, préparé à différentes concentrations (10, 25, 50, 75, 100, 200, 400, 800 $\mu\text{g/ml}$). Le mélange

est agité vigoureusement. Après un repos de 6 min à 23 °C, l'absorbance est mesurée à 734 nm. La courbe d'étalonnage est obtenue en utilisant une solution éthanolique de Trolox (acide carboxylique 6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetraméthylchroman) à différentes concentrations (0 à 500 µM). Les résultats sont exprimés en µM en équivalent de Trolox ET/g de poids sec de matériel végétal.

B. Piégeage de radical DPPH

Le composé chimique 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle (DPPH) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques, Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères. DPPH• reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire, La délocalisation provoque aussi la couleur violette bien caractéristique de la solution de DPPH•. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration violette (POPOVICIC *et al.*, 2009).

En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH. (2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl) de couleur violette se réduit en 2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazine de couleur jaune **figure 10** (MAATAOUI *et al.*, 2006) , Le DPPH change sa couleur du violet au jaune en utilisant le l'équation suivante : $DPPH = [(DPPH\ blanc - DPPH\ ech) / DPPH\ blanc] \times 100$.

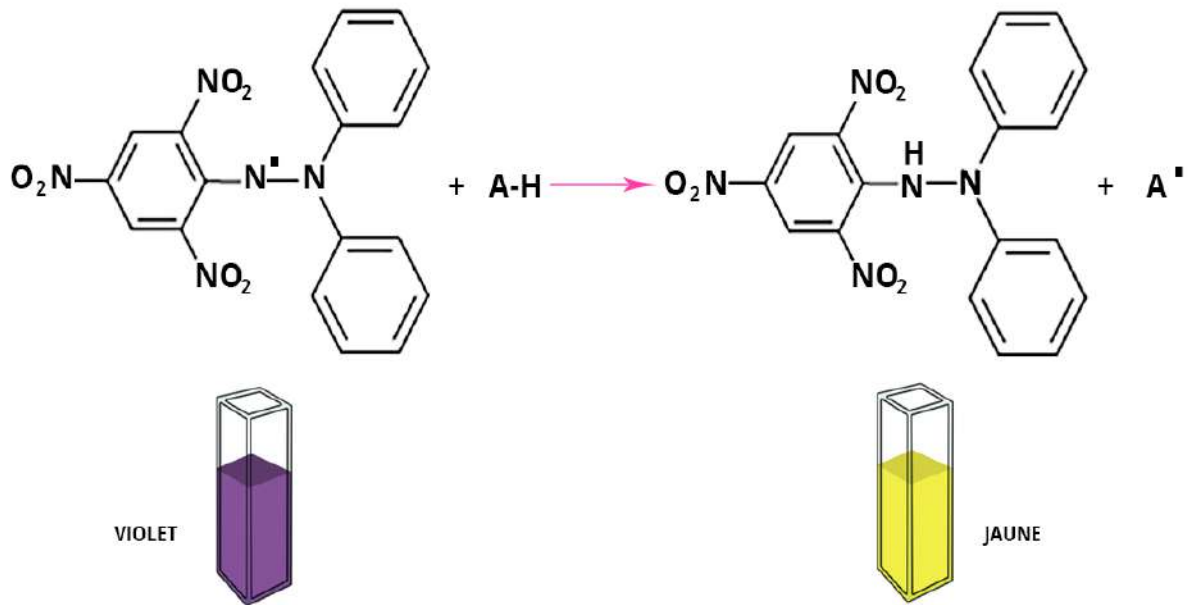


Figure09 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH (2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl)(Site web 6).

Le virage vers cette coloration et l'intensité de la décoloration découle, de la nature, de la concentration et de la puissance des principes actifs présents (KROYER 2003 ; ES SAFI *et al.*, 2007).

Le protocole

Un volume de 100 μ l de chaque d'échantillon ou de standard à différentes concentrations sont ajoutés à 3,9 ml de la solution méthanolique du DPPH• (0,025g/l). En parallèle, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 100 μ l de méthanol avec 3,9 ml de la solution méthanolique de DPPH. La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 515 nm après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à 30 °C. Le contrôle positif est représenté par des solutions d'antioxydant standard (Trolox et l'acide gallique) dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons tests (HEILEROVA *et al.*, 2003; BATISTON *et al.*, 2013).

L'acide ascorbique, la quercétine ainsi que le BHA (butyl-hydroxyanisole) sont utilisés comme témoins positifs (RACHED,2009).

Expression des résultats

Le pourcentage d'inhibition de l'extrait est calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{inhibition} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{d'extrait}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

A_{control} = $A_{\text{témoin(-)}}$: Absorbance du contrôle ; ce dernier contient du DPPH et du méthanol sans extrait.

$A_{\text{d'extrait}}$: Absorbance de l'échantillon testé (BERKAL et BOUCHAMA, 2016).

Les résultats sont exprimés par la moyenne de trois mesures \pm standard de déviation. Le pourcentage d'inhibition finalement exprimé sous forme d'IC50 est (concentration permettant d'obtenir 50% d'inhibition). Celle-ci est calculée à partir d'une droite de régression établie à l'aide des pourcentages d'inhibition (IP) enregistrés en fonction de la concentration de l'extrait (RACHED W, 2009).

I.3.5.2. Activité antimicrobienne

La technique utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne des différents extraits (MeOH, CF et DCM) est celle de diffusion en milieu gélosé.

Les souches microbiennes utilisées dans cette étude sont celles généralement infectées le pied des diabétiques qui sont : *E. coli*, *lysteria monocytogene*, *pseudomonas aerogenosa* et *pasturella sp*, *microcuccuss luteus*

I.3.5.2.1. Méthode de diffusion en disque sur milieu gélosé

La méthode de diffusion en disque sur milieu gélosé, selon le Comité National des Normes du Laboratoire Clinique (NCCLS, 2001). Cette méthode permet de déterminer l'activité inhibitrice de l'agent antibactérien, par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour du disque imprégné de l'extrait à tester (MOREIRA *et al.*, 2005).

Le milieu Müller Hinton a été utilisé. La gélose fondue est coulée en boîte de pétri de 90 mm de diamètre pour obtenir une épaisseur de 4 mm de gélose. Les boîtes refroidies sont séchées à l'étuve à 37°C avant d'être utilisées. Pour l'antibiogramme la technique de diffusion en milieu gélosé a été utilisée. Des disques de 5 mm de diamètre sont préparés. La surface de

la gélose est inondée avec 1 à 2 ml d'inoculum. Le surplus par la suite est aspiré à la pipette munie de poire. Les boîtes sont séchées pendant 15 minutes à 37°C. les disques chargés par 50 µl d'extraits différentes à l'aide d'une micropipette sont déposés à la surface de la gélose (OUBOUGOUE B, 2002). Les boites de Pétri sont incubées 37°C pendant 18 à 24 h (OUBOUGOUE B, 2002) et la lecture est effectuée par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition avec une règle graduée (MOREIRA *et al.*, 2005) :

- Non sensible (R) pour un diamètre ≤ 10 mm.
- Sensible (S) pour un diamètre entre 10 et 14 mm.
- Très sensible pour un diamètre entre 15 et 19mm.
- Extrêmement sensible pour un diamètre plus de 20 mm.

I.4. Analyses statistiques

Toutes les expériences ont été faites en triples et les résultats sont exprimés en $\text{moyen} \pm \text{écart type}$. L'analyse de variance a été réalisée afin de montré la significativité des différences enregistrées pour les extraits testés. La corrélation entre les concentrations en composés phénoliques et les différentes activités biologiques est effectuée par la mesure de coefficient de corrélation de Pearson. Toutes ces analyses ont été réalisées en utilisant XLSTAT 2021.

Plan expérimental

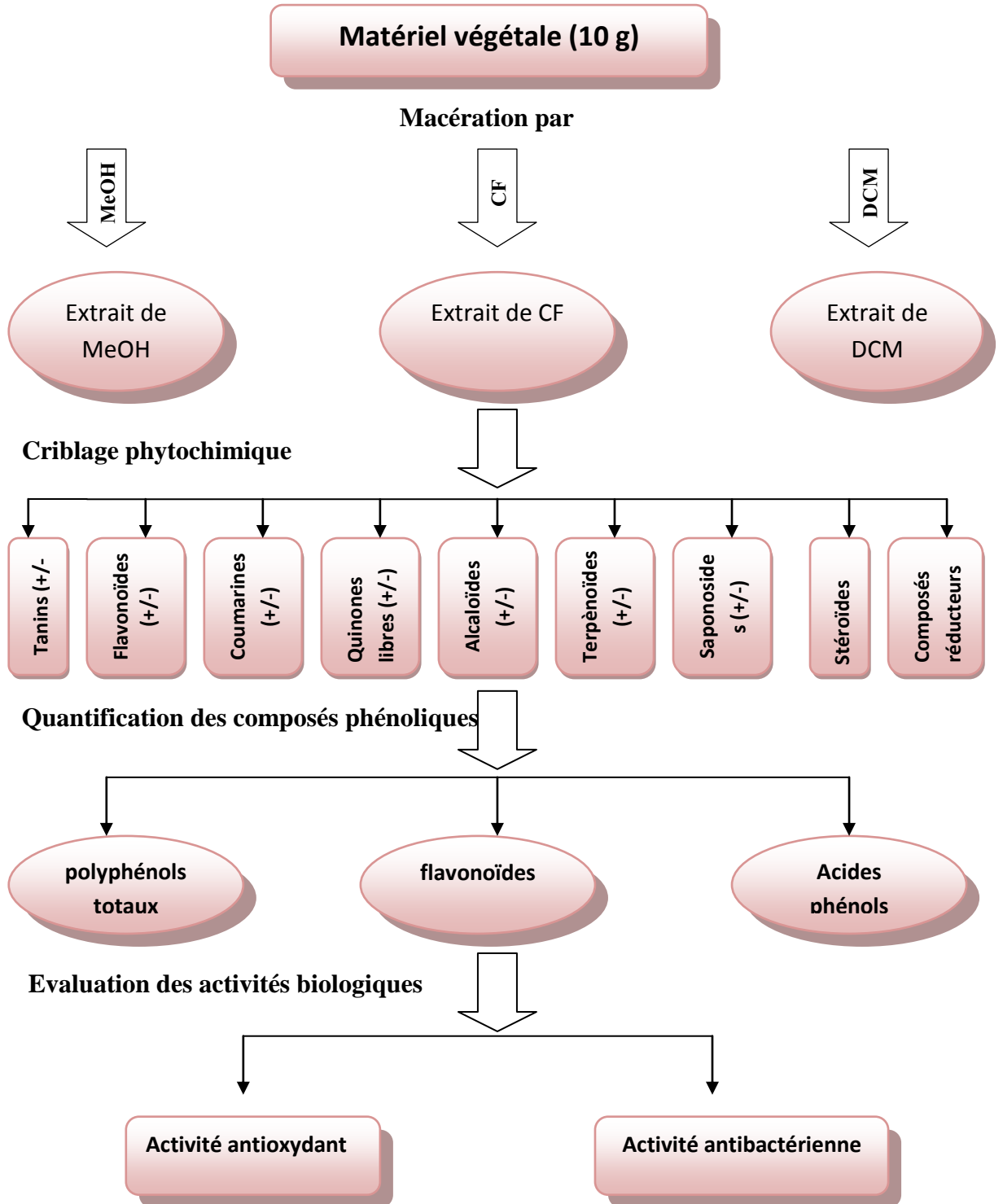


Figure 10 : Schéma général de différentes étapes suivies durant l'extraction des principes actifs de la partie aérienne d'*Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut, leur quantification et l'évaluation de leurs activités biologiques.

Chapitre II-Résultats et discussion

II.1. Rendement d'extraction

L'extraction des métabolites secondaires de la partie aérienne d'*Euphorbia guyoniana* a été effectuée par des solvants à polarité croissante (chloroforme, dichlorométhane et Méthanol) et a ainsi permis d'obtenir trois extraits : extrait de chloroforme (CF), extrait de dichlorométhane (DCM) et extrait méthanolique (MeOH).

Après l'extraction, le rendement de chaque extrait a été déterminé par rapport à 10 g du matériel végétal. Les résultats obtenus sont dans la figure 11.

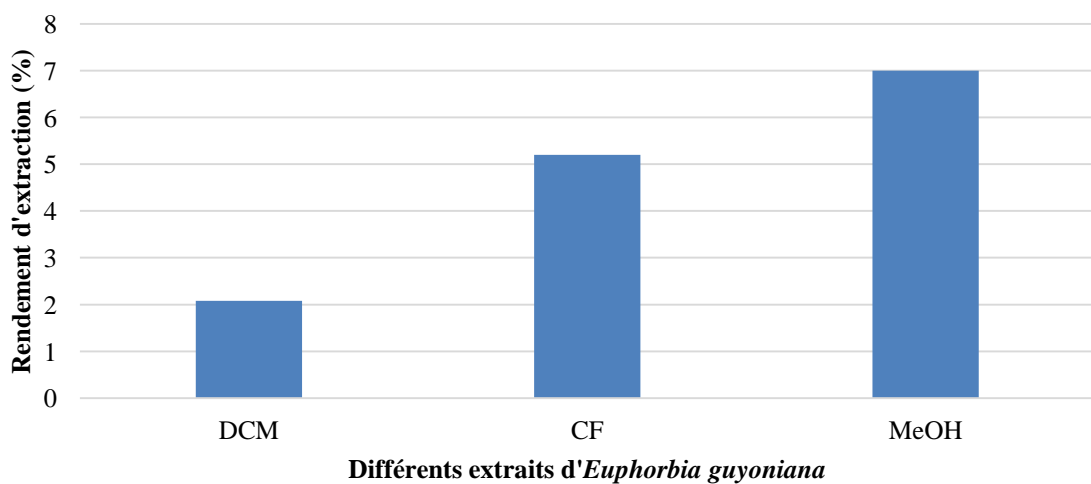


Figure 11 : Rendement d'extraction des différents extraits d'*Euphorbia guyoniana*.

La figure ci-dessus montre que le rendement diffère selon le solvant utilisé pour l'extraction. Le rendement d'extraction le plus élevé est enregistré pour l'extrait MeOH qui est égal à 7,00% suivi par celui de CF (5,20%), alors que le rendement le plus faible est obtenu avec l'extrait de DCM qui est de l'ordre de 2,08 %.

L'analyse statistique effectuée montre qu'il y a des différences significatives entre les solvants concernant le rendement d'extraction ($P < 0,028$; $\alpha < 0,05$).

Le rendement d'extraction est le rapport de la quantité des substances naturelles extraites par l'action extractive d'un solvant à la quantité de ces substances contenues dans la matière végétale. Il dépend de plusieurs facteurs tels que: le solvant, le pH, la température, le temps d'extraction, la composition de l'échantillon et le rapport solide/liquide (M'HIRI, 2015 ; QUY DIEM DO *et al.*, 2014).

La polarité du solvant utilisé pour l'extraction a une influence importante sur les composés extraits et leurs rendements. L'utilisation de solvants à polarités différentes permet de séparer les composés de l'extrait selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction. Ceci explique les différences enregistrées entre les différents extraits, méthanol a la polarité la plus élevée (polarité de 5,1), suivi par celle de chloroforme (polarité 4,1) et enfin celle de dichlorométhane (polarité 3,1) (HANDA S *et al.*, 2008). Dans notre étude, l'extraction est menée à la température ambiante. La température est un accélérateur de l'extraction, elle augmente la solubilité des composés phénoliques dans le solvant. Toutefois, en raison de la sensibilité des composés phénoliques à la chaleur, une température trop élevée peut conduire à leur décomposition et leur dégradation (WANG & WELLER, 2006; ROUTRAY & ORSAT, 2012).

II.2. Analyse phytochimique

II.2.1. Qualitatif

Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence des différents métabolites au niveau de la partie aérienne d'*Euphorbia guyoniana*. Les résultats sont présentés dans le tableau I.

Tableau I : Résultats de criblage phytochimique des différents extraits d'*Euphorbia guyoniana*.

Métabolite recherché	Test utilisé	MeOH	CF	DCM
Tanins	FeCl ₃	+	-	-
	Réactif de Stiasny	-	-	-
Flavonoïdes	Anthocyanes	-	-	-
	Réaction à la cyanidine	+	-	-
Coumarines	Ajout de base NaOH	+	-	-
Quinones libers	Ajout de base NaOH	+	-	-
Alcaloïdes	Réactif de Mayer	-	-	-
	Réactif de Wagner	-	-	-
Terpènoïdes	Test de Libermann-Burchard	-	-	-
	Chloroforme	+	+	-
Saponosides	Test de mousse	-	-	-
Stéroïdes	Ajoute l'anhydride acétique et l'acide sulfurique	+	-	-
Composés réducteurs	Pouvoir réducteur de liqueur de Fehling	-	-	-

+ : Présence ; - : absence

L'étude phytochimique réalisée sur la partie aérienne d'*Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut. Indique la présence des différents types des métabolites secondaires, ce qui montre la richesse de cette espèce en composés phénoliques (tanins, flavonoïdes, coumarines et quinones libres) et les stéroïdes et aussi les composés terpéniques et l'absence des alcaloïdes et les composés réducteurs.

Selon le tableau I, les tanins et les flavonoïdes de type flavones flavones, les coumarines, les quinones, les stéroïdes sont présents seulement dans l'extrait méthanolique

et non dans les deux autres extraits (CF et DCM). Et les terpénoïdes présents dans les extraits (MeOH et CF) et absence dans l'extrait de DCM. Et pour les métabolites de les alcaloïdes et saponosides et les composés réducteurs sont absents dans les trois extraits (MeOH, CF et DCM).

les solvants sont classés en fonction de leur polarité et leur capacité à extraire certaines molécules. L'extraction d'une molécule se fera toujours par solvant de même polarité Les solvants polaires tels que le méthanol permet l'isolement de molécules polaires : terpénoïdes phénols, alcaloïdes, protéines, acide amines. Les solvants apolaires comme, le chlorure de méthylène, le chloroforme vont extraire les carbures, les lipides, les stérols, les huiles essentielles et la chlorophylle (ANTON et WICHTL, 2003).

les composés phénoliques (flavonoïdes, tanins quinones et des coumarines) ont en majorité une très grande affinité pour les solvants polaires (MeOH) et sont généralement plus solubles dans les mélanges hydro-alcooliques (MAHMOUDI et COLL, 2012).

Composés terpéniques sont plus importants dans les extraits (MeOH et CF) par le test de chloroforme, cela est due à l'utilisation du chloroforme seul qui assure une extraction importante des composés phytochimiques apolaires (TIWARI *et al.*, 2011). Le chloroforme est couramment utilisé pour l'extraction des composés apolaires, (GREEN RJ, 2004).

Tanins sont des antioxydants qui interviennent dans la neutralisation des radicaux libres, par conséquent réduisent les maladies cardiaques et inflammatoires. Les tanins ont des propriétés astringentes et vermifuges des herbivores. La principale utilisation des tanins est le tannage (comme son nom l'indique) des peaux (LAOUINI., 2014).

Les flavonoïdes ont un large éventail d'activités pharmacologiques qui incluent des activités antioxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires, antimutagènes, antitumorales, antidiabétiques, vaso-relaxantes, immunomodulatrices et à la fois œstrogéniques et anti-œstrogéniques (LIN *et al.*, 2014).

La majorité des coumarines et leurs dérivées ont été soumises à de profondes investigations afin d'évaluer leurs effets sur la santé humaine. Les recherches ont montré qu'elles peuvent être agiter comme des agents anti HIV (MANOLOV., 1995), anti tumoraux (EL-FARARGY A.F., 1991), anticancéreux, antimicrobiens (KHELIL., 2017) anti inflammatoires (PATONAY., 1991), antifongiques (REZINE F., 2017), anti

oxydants(EMMANUEL-GLOTA A.A.,2001) et même vasodilatateurs. Ces composés peuvent aussi manifester des effets oestrogéniques et antinéoplasiques. Elles inhibent l'agrégation plaquettaire ainsi que l'activité d'acétylcholinestérase. Deux chercheurs Kaneko, et Zhang ont élucidé en particulier l'influence de la structure des coumarines sur leur activité anti radicalaire (HADJ SALEM ,J.,2009). Les coumarines sont considérées comme des phytoalexines produites en réponse à des attaques pathogènes ou à des stress antibiotiques (ROUXEL.T., 1989).

Les terpénoïdes sont des métabolites végétaux importants. Ils comprennent des substances telles que les parfums floraux, qui servent d'attractifs pour les insectes, l'huile de pin, les inhibiteurs de croissance, les deux hormones végétales, l'acide gibbérellique et l'acide abscissique, et certaines qui sont insecticides (ZERROUKI N.,2009)..

Quinones libres sont des composées irritants qui possèdent un effet fréquemment répulsif. ils ont aussi des propriétés laxatives dou leur emploi en pharmacie(ZERROUKI N.,2009).

Cette richesse en principes actifs peut confère à la plante *Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut certaines propriétés, ce qui peuvent justifier son utilisation en médecine traditionnelle.

II.2.2. Quantification des composés phénoliques

En général, les composés phénoliques des plantes sont des composés polaires, qui sont généralement extraits avec des solvants polaires (ZAM *et al.*, 2012). Ils sont des substances présentes dans tous les végétaux et dans tous les organes de la plante, ils possèdent un noyau aromatique portant un ou plusieurs groupements hydroxyles (NACZK et SHAHIDI, 2003 ; BARBONI., 2006 ; SUN *et al.*, 1998). Les profils phénoliques diffèrent lorsque différents solvants étaient utilisés (ZAM *et al.*, 2012).

L'étude quantitative des différents extraits préparés à partir de la partie aérienne *Euphorbia guyoniana* au moyen des dosages spectrophotométriques avaient pour objectif la détermination des teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en acides phénols. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des effets pharmacologiques des plantes leur sont attribués. Pour ce faire, trois courbes d'étalonnages ont été préparées en utilisant des composés purs (acide gallique, rutine et acide caféique) (figures 12, 14 et 16).

II.2.2.1. Teneur en polyphénols totaux

Dans le but de déterminer la teneur en polyphénols totaux de nos échantillons. Un dosage des polyphénols totaux a été déterminé par spectrophotométrie, selon la méthode colorimétrique utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dosage est basé sur la réduction de l'acide phosphomolybdique et phosphotungstique par les groupements hydroxyles présents dans l'extrait (ALI-RACHEDI *et al.*, 2018 ; SINGLETON *et al.*, 1999).

Avant de passer à la détermination de la teneur en polyphénols totaux dans les extraits d'*Euphorbia guyoniana*, nous avons établi une courbe d'étalonnage en utilisant l'acide gallique (0-800 µg/ml) comme standard.

Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg d'acide gallique/g) en utilisant l'équation de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (1mg/ml) pour déterminer les concentration en polyphénols totaux des différents extraits (figure 12).

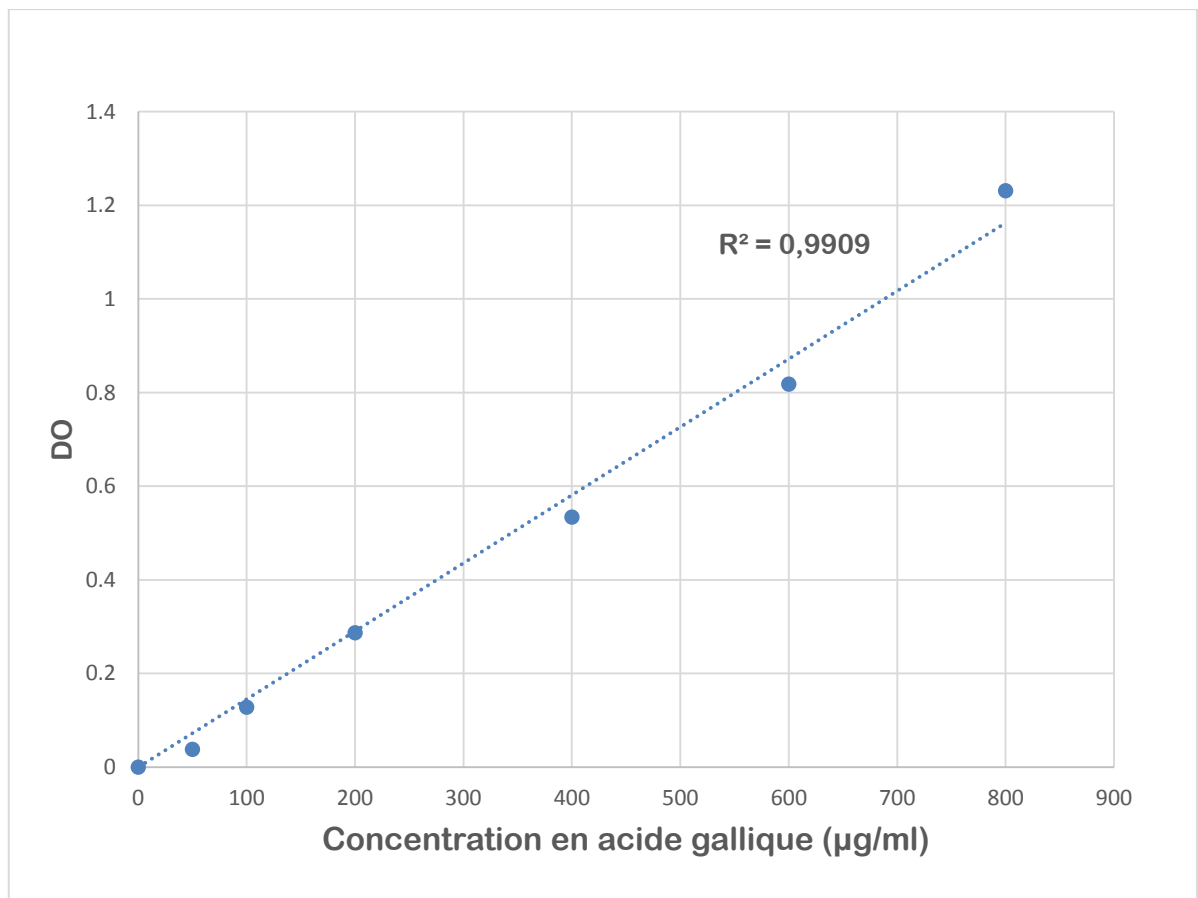


Figure 12 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Les teneurs en polyphénols totaux des différents extraits de la partie aérienne d'*Euphorbia guyoniana* sont illustrées dans la figure 13.

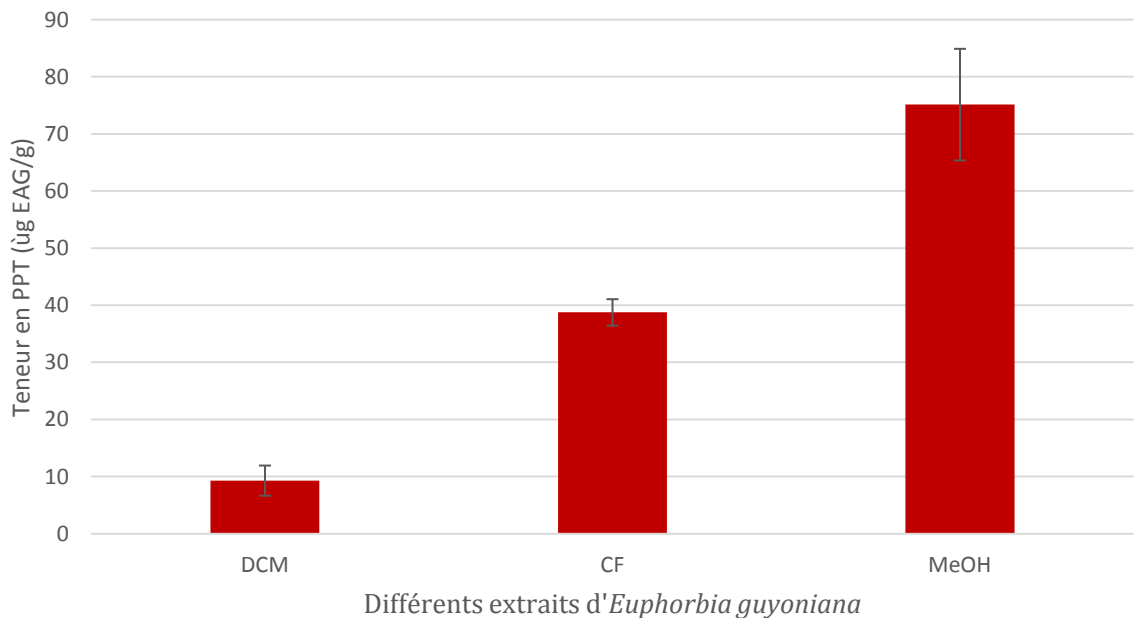


Figure 13 : Teneur en polyphénols totaux des différents extraits de la partie aérienne d'*Euphorbia guyoniana*

Il ressort de la figure 13 que l'extrait MeOH est l'extrait le plus riche en polyphénols totaux avec un taux de (75,13±9,77 mg EAG/g), suivi par l'extrait de CF (38,77±2,31 mg EAG/g), tandis que la teneur la plus faible est enregistrée pour l'extrait de DCM (9,32±2,64 mg EAG/g).

Statistiquement, les différences enregistrées entre les différents extraits de la partie aérienne d'*Euphorbia guyoniana* sont hautement significatives ($P < 0,001$; $\alpha < 0,05$).

D'après ces résultats, on déduit que le contenu phénolique dans les extraits examinés, dépend de la polarité du solvant utilisé pour l'extraction. L'extraction des polyphénols par macération, bien que généralement longue et exige des solvants organiques qui sont chers et dangereux pour la santé, est la seule méthode utilisable dans le cas de l'extraction d'un ensemble de molécules fragiles (BEN AMOUR, 2008).

La solubilité des polyphénols dépend principalement du nombre de groupements hydroxyles, de poids moléculaire et de la longueur de la chaîne carbonique de squelette de base (MAHMOUDI et ATIK., 2011) et régie par le type de solvant utilisé, le degré de polymérisation des composés phénoliques, ainsi que par l'interaction de phénoliques avec d'autres constituants alimentaires et formation de complexe insoluble (GALVEZ *et al.*, 2005). À cette fin, le méthanol était recommandé et fréquemment utilisé pour l'extraction de phénoliques (GALVEZ *et al.*, 2005 ; DE ABREU et MAZZAFERA., 2005). D'après FALLEH *et al.* (2018), le méthanol est le solvant approprié pour une récupération importante de polyphénols, car ces derniers constituent une classe des molécules plutôt hydrosolubles, sont majoritairement extraits par des solvants de polarité moyenne ou forte (FALLEH *et al.*, 2008), ce qui explique la forte teneur en polyphénols dans l'extrait méthanolique en comparaison avec les deux autres extraits.

II.2.2.2. Teneur en flavonoïdes

La méthode colorimétrique de KIM *et al.* (2003) a été utilisée pour déterminer le contenu total des flavonoïdes.

La quantification des flavonoïdes a été effectuée à partir de l'équation de la régression linéaire déduite de la courbe d'étalonnage (Figure 14). Les valeurs obtenues sont exprimées en mg ER/g du poids sec de matériel végétal :

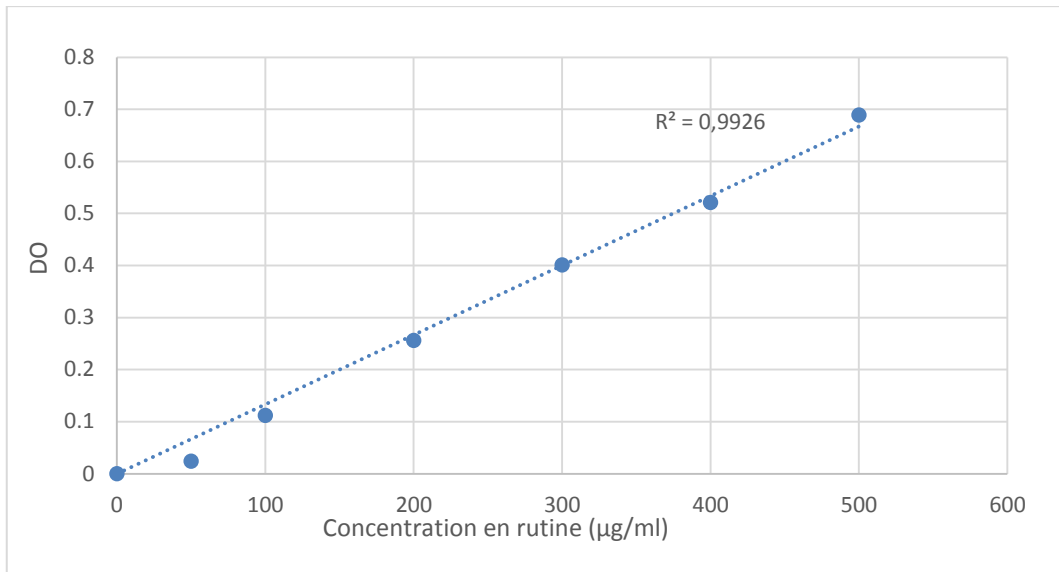


Figure 14 : Courbe d'étalonnage de la rutine

Les concentrations des flavonoïdes des extraits de la partie aérienne d'*Euphorbia guyoniana* sont présentées dans la figure 15.

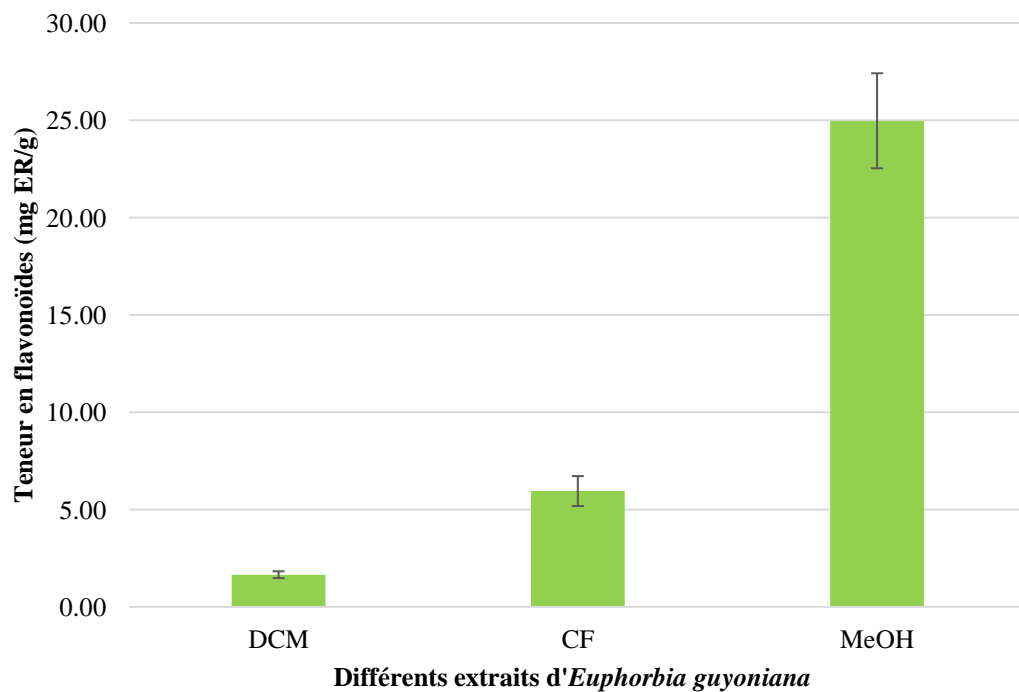


Figure 15 : Teneur en flavonoïdes des différents extraits d'*Euphorbia guyoniana*

Selon la figure 13, il apparaît que l'extrait MeOH a la meilleure teneur en flavonoïdes qui est égale à 24, 97±2,44 mg ER/g suivi par l'extrait de CF qui a une teneur de l'ordre de 5,94±0,77mg ER/g. le taux le plus faible en flavonoïdes est obtenu pour l'extrait de DCM (1,65±0,17 mg ER/g) (Fig.15).

L'analyse de variance réalisée montre que les différences observées entre ces extraits sont hautement significatives ($P < 0,001$; $\alpha < 0,05$).

La concentration des flavonoïdes dans les extraits de la plante, dépend de la polarité des solvants utilisés dans la préparation des extraits (SINGLETON V, 1999). Le méthanol a la polarité la plus élevée, suivie successivement de celles de chloroforme, dichlorométhane (HANDA S *et al.*, 2008). Ils dépendent également du nombre de groupements hydroxyles (NACZK et SHAHIDI., 2003 ; BARBONI., 2006 ; SUN *et al.*, 2011).

Selon LEE *et al.* (2003), la méthode d'extraction et la région de récolte influencent le rendement. La teneur phénolique d'une plante est étroitement liée à un ensemble de facteurs intrinsèques et extrinsèques, en particulier les conditions climatiques, le stade de développement de la plante, la récolte et les conditions de stockage (PODSEDEK., 2007; FALLEH *et al.*, 2008).

Le choix du solvant est basé sur la solubilité et la polarité des flavonoïdes recherchés et celle du solvant. Les flavonoïdes se dissolvent mieux dans des solvants ayant les valeurs de LogP les plus proches (KASSING *et al.*, 2010; JAWAD & LANGRISH., 2012). Le solvant ayant le LogP proche de LogP de flavonoïdes totaux est l'éthanol et le méthanol à une concentration allant de 70% à 80% (M'HIRI N., 2015).

L'examen de ces résultats permet de mettre en évidence une corrélation entre la teneur des extraits en flavonoïdes et en composés phénoliques. Ceci est logique étant donné que les flavonoïdes représentent les composés majoritaires des polyphénols (AGANGA., 2001).

II.2.2.3.Teneur en acides phénols

La teneur en acides phénols des différents extraits d'*Euphorbia guyoniana* a été effectuée selon la méthode de Szafer Hadjrych (2004).

Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide caféique par gramme (mg d'acide caféique/g) de matière sèche en utilisant l'équation de la courbe d'étalonnage de l'acide caféique (1mg/ml) (figure 16).

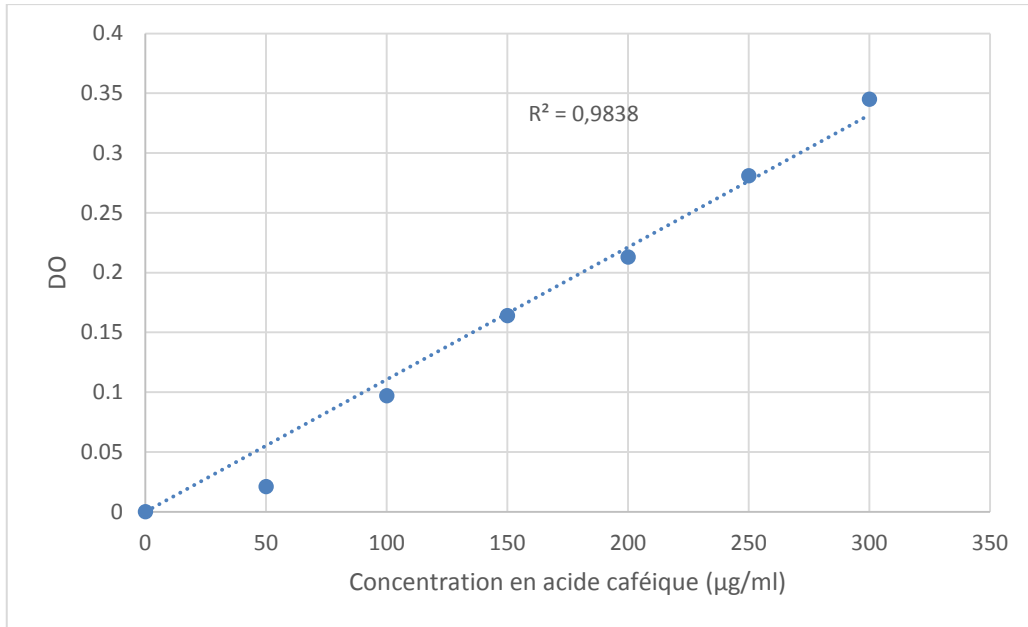


Figure 16 : Courbe d'étalonnage de l'acide caféique.

Les résultats des teneurs en acides phénols des différents extraits d'*Euphorbia guyoniana* sont présentés dans la figure 17.

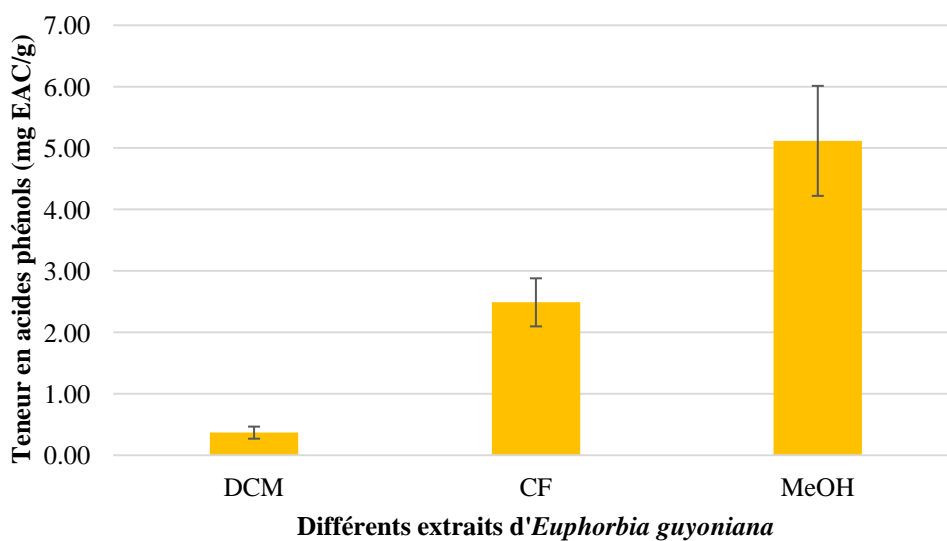


Figure 17: Teneur en acides phénols des différents extraits d'*Euphorbia guyoniana*.

Les résultats de la figure 17 montre que l'extrait méthanolique a la teneur en acides phénols la plus importante qui est de l'ordre de $5,12 \pm 0,90$ mg EAC/g suivi par l'extrait de CF avec un taux de $(2,49 \pm 0,39)$ mg EAC/g). La teneur la plus faible a été enregistrée pour l'extrait de DCM ($0,37 \pm 0,10$ mg EAC/g) (Fig. 17).

Les différences constatées pour les extraits de la partie aérienne d'*Euphorbia guyoniana* sont hautement significatives ($P < 0,001$; $\alpha < 0,05$).

Cette variation peut s'expliquer par le fait que l'extraction des acides phénols, dépend de leur nature chimique, du solvant utilisé et sa polarité et des conditions opératoires (DEBA F *et al.*, 2008). concernant les solvant utilisés pour la préparation des extraits, le méthanol a la polarité la plus élevée, suivie successivement de celles de chloroforme, dichlorométhane (HANDA S *et al.*, 2008)

II.3. Activités biologiques

II.3.1. Activité anti-oxydante

La plupart des tests antioxydants consistent à étudier la disparition ou la formation d'un produit spécifique dans un milieu soumis à un stress oxydant. Cependant, chaque test permet d'étudier l'inhibition d'une seule espèce oxydante ou bien la protection d'une seule cible à la fois. Ainsi, l'évaluation de l'activité anti-oxydante par une technique donnée ne fournit que des informations partielles sur l'activité des composés. Il est donc nécessaire de réaliser différents tests antioxydants afin de percevoir la capacité réelle de protection d'un composé dans un milieu biologique complexe (NADAL, 2009).

Le principe de ceux-ci repose sur un changement de couleur qui a été suivi par la lecture de l'absorbance à des longueurs d'ondes spécifiques. Dans ce qui suit, on présente les résultats du potentiel antioxydant des extraits sélectionnés pour cette étude.

L'activité anti-oxydante des extraits de MeOH, CF et DCM d'*Euphorbia guyoniana* a été évaluée par deux tests à savoir l'inhibition de radical cation ABTS^{•+} et le piégeage de radical DPPH. Ces tests nous a permis de déterminer la capacité de nos extraits à neutraliser ces radicaux présents dans le milieu réactionnel. L'activité anti-oxydante des extraits a été évaluée par le calcul de la valeur IC₅₀ qui indique la concentration nécessaire de l'extrait qui

inhibe 50% du radical libre, il est à noter que plus la concentration de l'extrait est petite plus l'extrait est un bon antioxydant (HAMIA *et al.*,2014).

II.3.1.1. Inhibition de radical cation d'ABTS⁺

Le radical cation d'ABTS⁺ est utilisé pour évaluer le pouvoir antioxydant de fluides biologiques, de mélanges complexes ou de composés purs. Il est capable de réagir avec des antioxydants classiques de type phénols et thiols, mais aussi avec tout composé donneur d'hydrogène ou d'électron (RICE-EVANS *et al.*, 1994. RICE-EVANS *et al.*,1995).

l'inhibition de radical cation ABTS par l'antioxydant standard (le Trolox) a été déterminée et les résultats obtenus permet de tracer une courbe d'étalonnage présentée dans la figure 18.

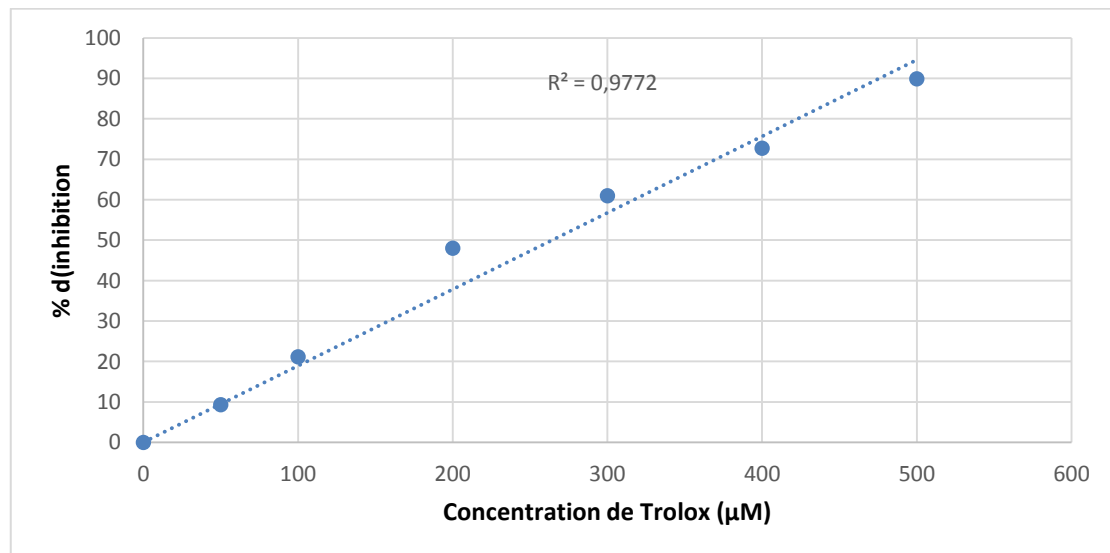


Figure 18 : Courbe d'étalonnage d'inhibition de radical cation ABTS par le Trolox

Le résultat de l'activité antioxydante évaluée par le test ABTS et exprimés en µM équivalent de Trolox/g des différents extraits d'*Euphorbia guyoniana* sont présentées dans la figure 19.

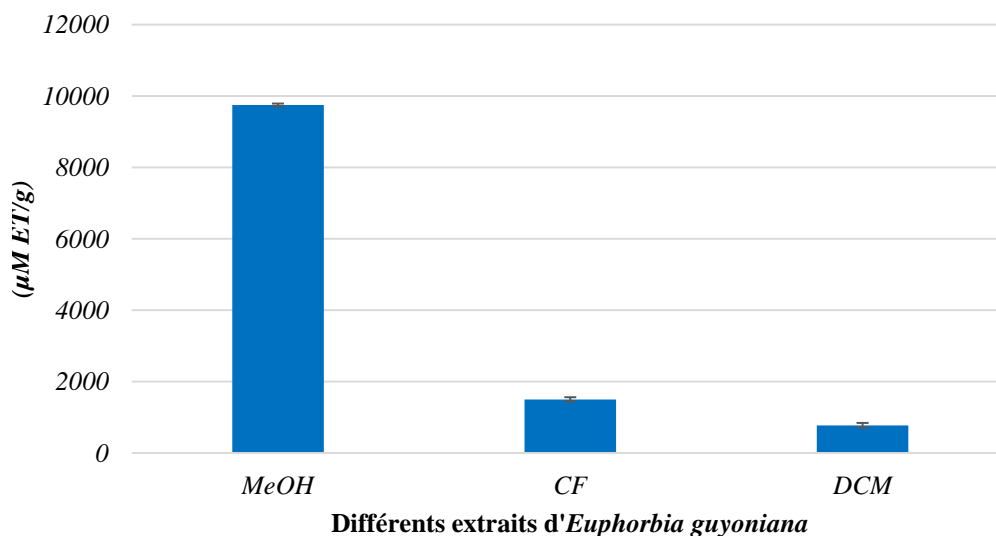


Figure 19 : Activité anti-oxydante évaluée par le test ABTS des différents extraits d'*Euphorbia guyoniana*

Au vu des résultats présentés dans la figure 19, il apparaît que l'extrait MeOH a l'activité inhibitrice de radical cation d'ABTS^{•+} la plus élevée qui est de l'ordre de 9747,71±37,24 μM ET/g, suivie par celle de l'extrait de CF (1497,22±60,50 μM ET/g). A l'opposé, l'extrait de DCM a la capacité inhibitrice la plus faible qui est égale à 771,95± 64,91 μM ET/g.

Les analyses statistiques effectuées montrent que les différences observées pour l'activité anti-oxydante évaluée par le test ABTS des différents extraits d'*Euphorbia guyoniana* sont hautement significatives ($P < 0,001$; $\alpha < 0,05$).

Les valeurs d'IC₅₀ des différents extraits d'*Euphorbia guyoniana* ainsi que les standards (Trolox et acide gallique) ont été déterminées et les résultats sont illustrés dans le tableau II.

Tableau II : Valeurs d'IC₅₀ des différents extraits d'*Euphorbia guyoniana* ainsi que les standards (Trolox et acide gallique) pour le test ABTS

Référence et les extraits	IC ₅₀ (µg/ml)
Trolox	218,8 ±18,89
Acide gallique	62,22 ±4,59
MeOH	165,08±12,24
CF	625,33±58,13
DCM	805,1±73,33

Il ressort de tableau II que l'extrait méthanolique d'*Euphorbia guyoniana* est le plus efficace dans l'inhibition de radical cation d'ABTS⁺ avec une valeur d'IC₅₀ égale à 165,08±12,24 µg/ml en comparaison avec le Trolox (IC₅₀=218,80±18,89 µg/ml), mais cette concentration reste significativement supérieur à celle de l'acide gallique (62,22 ±4,59µg/ml) (Tableau II).

Il apparait que la capacité anti-oxydante des extraits est proportionnelle à la polarité des solvants utilisés (BOUCHOUKA., 2016).

Cette activité peut être attribuée à la présence des polyphénols. En effet, la corrélation entre l'activité anti-oxydante et la teneur en composés phénoliques est positive égale à (P= 0,907 ; r= 0,923) de même, plusieurs études ont rapporté que l'activité anti-oxydante des plantes qui ont des propriétés thérapeutique est due à la présence certains métabolites principalement les polyphénols (RICE-EVANS *et al.*, 1997 ; POKORNY *et al.*, 2001 ; VIRGILI et SCACCINI., 2001).

ERTAS *et al.* (2016) ont montré que l'extrait méthanolique d'*Euphorbia macroclada* a la meilleure capacité inhibitrice de radical cation ABTS avec une valeur d'IC₅₀ égale à 6,71±0,16 µg/ml, qui est inférieur à notre résultat.

II.3.1.2. Piégeage du radical DPPH :

Le 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyle (α,α -diphenyl- β -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques (ESPARZA *et al.* 2005 ; HYNES, O'COINCEANAINN., 2001). Il est recommandé pour des composés contenant des atomes H labiles de type SH, NH et OH. Il

s'effectue à température ambiante, Cette méthode est largement utilisée pour tester l'activité antiradicalaire de jus de fruits et légumes ou d'extraits riches en composés phénolique (TORREGGIANI *et al.*, 2005 ; AFANAS'EV *et al.*,1989 ; MUROTA *et al.*,2004).

l'inhibition de Piégeage du radical DPPH par l'antioxydant standard (le Trolox) a été déterminée et les résultats obtenus permet de tracer une courbe d'étalonnage présentée dans la figure 20.

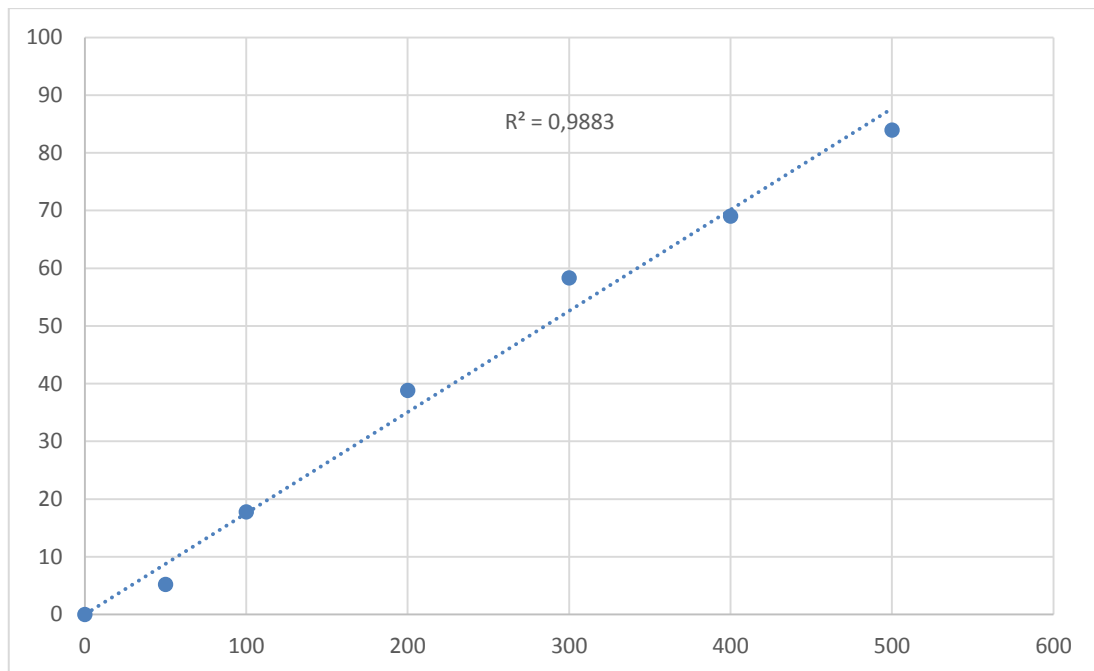


Figure 20 : Courbe d'étalonnage d'inhibition de Piégeage du radical DPPH par la Trolox

Le résultat de l'activité anti-oxydante évaluée par le test DPPH et exprimés en µM équivalent de Trolox/g des différents extraits d'*Euphorbia guyoniana* sont présentés dans la figure 16.

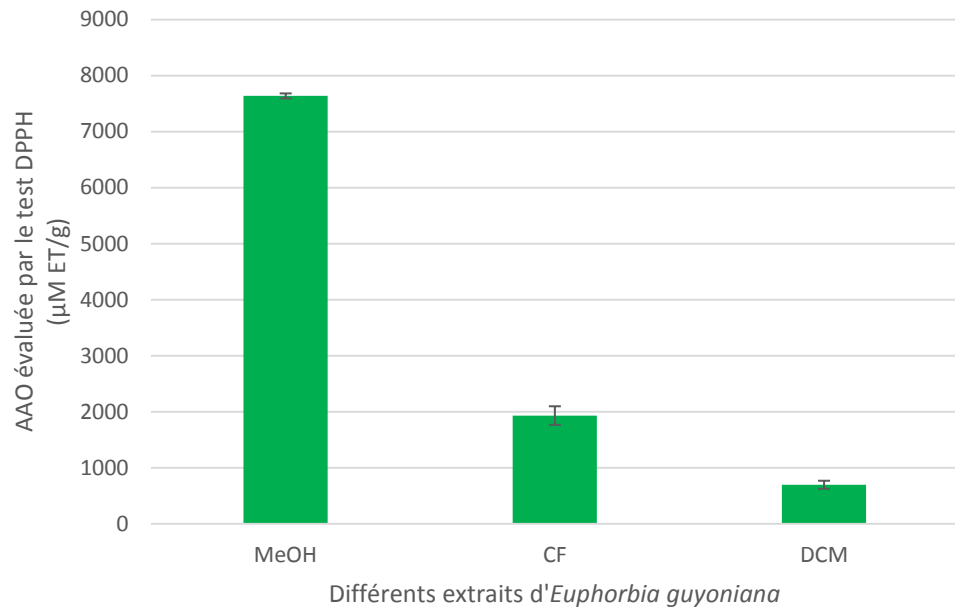


Figure 21 : Activité anti-oxydante évaluée par le test DPPH des différents extraits d'*Euphorbia guyoniana*

Les résultats présentés dans la figure 16 indiquent que l'extrait MeOH a le pouvoir piègeur de radical DPPH le plus élevé qui est de l'ordre de $7636,18 \pm 44,76 \mu\text{M ET/g}$, suivi par celui de l'extrait de CF ($1933,90 \pm 165,37 \mu\text{M ET/g}$). Par contre, l'extrait de DCM a enregistré le pouvoir antioxydant le plus faible qui est égal à $699,05 \pm 71,61 \mu\text{M ET/g}$ (Fig. 16).

L'analyse de variance réalisée montre qu'il y a des différences très hautement significatives entre les différents extraits d'*Euphorbia guyonina* concernant la capacité à piéger le radical DPPH ($P < 0,000$; $\alpha < 0,05$)

Les valeurs d' IC_{50} des différents extraits d'*Euphorbia guyoniana* ainsi que les standards (Trolox et acide gallique) ont été déterminées et les résultats sont résumés dans le tableau III.

Tableau III : Valeurs d'IC₅₀ des différents extraits d'*Euphorbia guyoniana* ainsi que les standards (Trolox et acide gallique) pour le test DPPH.

Référence et les extraits	IC ₅₀ (µg/ml)
Trolox	251,33± 21,21
acide gallique	71,12±7,07
MeOH	189,98±17,57
CF	578,00± 51,28
DCM	843,09±85,67

Selon le tableau III, il est à noter que l'extrait de MeOH d'*euphorbia guyoniana* est le meilleur dans l'inhibition de radical DPPH avec une valeur d'IC₅₀ égale à 189,98±17,57 µg/ml qui est inférieure à celle de Trolox (IC₅₀=251,33± 21,21 µg/ml). Cependant, cette valeur est nettement supérieure à l'IC₅₀ de l'acide gallique (71,12±7,07 µg/ml) (Tableau III).

Aussi, nous avons remarqué que l'extrait méthanolique est doté d'une activité inhibitrice plus forte que l'extrait CF et l'extrait DCM de l'espèce investiguée. L'activité anti-oxydante et la quantité des phénols d'un extrait sont des paramètres qui dépendent fortement du procédé d'extraction, de la nature du solvant et de sa polarité (BOUCHOUKA, 2016).

La différence dans l'activité inhibitrice des trois extraits de la partie aérienne *Euphorbia guyoniana*, est peut être due à la différence de la teneur en antioxydants (les composés phénoliques) dans les trois extraits. En effet, le calcul de coefficient de Pearson montre qu'il y a une corrélation positive entre l'activité anti-oxydante évaluée par le test DPPH et les teneurs en différentes classes des composés phénoliques (P=0,874 ; r=0,981).

Dans le cas des composés phénoliques, le mécanisme principal d'action est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome H sur le DPPH' alors transformé en une molécule stable DPPHH (POPOVICIC *et al.*, 2009).

L'activité anti-oxydante varie sous l'influence du taux et la nature des composés phénoliques. Ces derniers sont affectés par plusieurs paramètres tels que l'espèce, l'organe, la période de la récolte et la méthode d'extraction (WOJDYLO *et al.*, 2007).

ERTAS *et al.* (2016) ont montré que l'extrait méthanolique d'*Euphorbia macroclada* a la meilleure capacité de piégeage de DPPH avec une valeur d'IC₅₀ égale à 46,91±0,32 µg/ml, qui est nettement inférieur à celui obtenu dans la présente étude.

II.3.1.3. corrélation entre l'activité antioxydante et les teneurs en composés phénoliques :

Pour évaluer la dépendance entre plusieurs variables en même temps. Les résultats dans ces tableau contenant les matrice de corrélation (Pearson) (P) et coefficient de détermination (r) entre chaque variable et les autres.

Les valeurs de Matrice de corrélation (Pearson) (P) de différents paramètres étudiés pour l'extrait méthanolique ont été déterminées et les résultats sont illustrés dans le tableau IV.

Tableau IV : Matrice de corrélation (Pearson) (P) de différents paramètres étudiés pour l'extrait méthanolique.

Variabes	PPT	FLV	AcPh	ABTS	DPPH
PPT	1				
FLV	0,891	1			
AcPh	0,912	0,783	1		
ABTS	0,907	0,816	0,890	1	
DPPH	0,874	0,933	0,980	0,900	1

Les valeurs de Coefficients de détermination (r) de différents paramètres étudiés pour l'extrait méthanolique ont été déterminées et les résultats sont résumés dans le tableau V.

Tableau V : Coefficients de détermination (r) de différents paramètres étudiés pour l'extrait méthanolique.

Variables	PPT	FLV	AcPh	ABTS	DPPH
PPT	1				
FLV	< 0,001	1			
AcPh	0,960	0,917	1		
ABTS	0,923	0,956	0,987	1	
DPPH	0,981	0,945	0,988	0,960	1

II.3.2. Activité antibactérienne

Les plantes sont également utilisées pour leur propriété antibactérienne, et comme sources de médicaments, les plantes restent encore exploitées surtout dans le domaine de la microbiologie médicale. Il est noté que la plupart des antibiotiques prescrits dérivent des microorganismes. Aujourd'hui, le potentiel thérapeutique des produits végétaux est reconsidéré et montre une efficacité particulière (MOHAMMEDI, 2013).

L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits d'*Euphorbia guyoniana* a été réalisée en utilisant la méthode de diffusion sur la gélose contre cinq espèces bactériennes pathogènes, il s'agit d'*E. coli* (Enterobacteriaceae) (Gram négatives), *Micrococcus luteus* (Micrococcaceae) (Gram positif), *Pasturella sp* (Pasteurellaceae) (Gram négatif), *Listeria monocytogenes* (Listeriaceae) (Gram positif) et *Pseudomonas aeruginosa* (pseudomonadaceae) (Gram négative).

Les diamètres des zones d'inhibition des différents extraits d'*Euphorbia guyoniana* sur les souches testées sont présentés dans la figure 22.

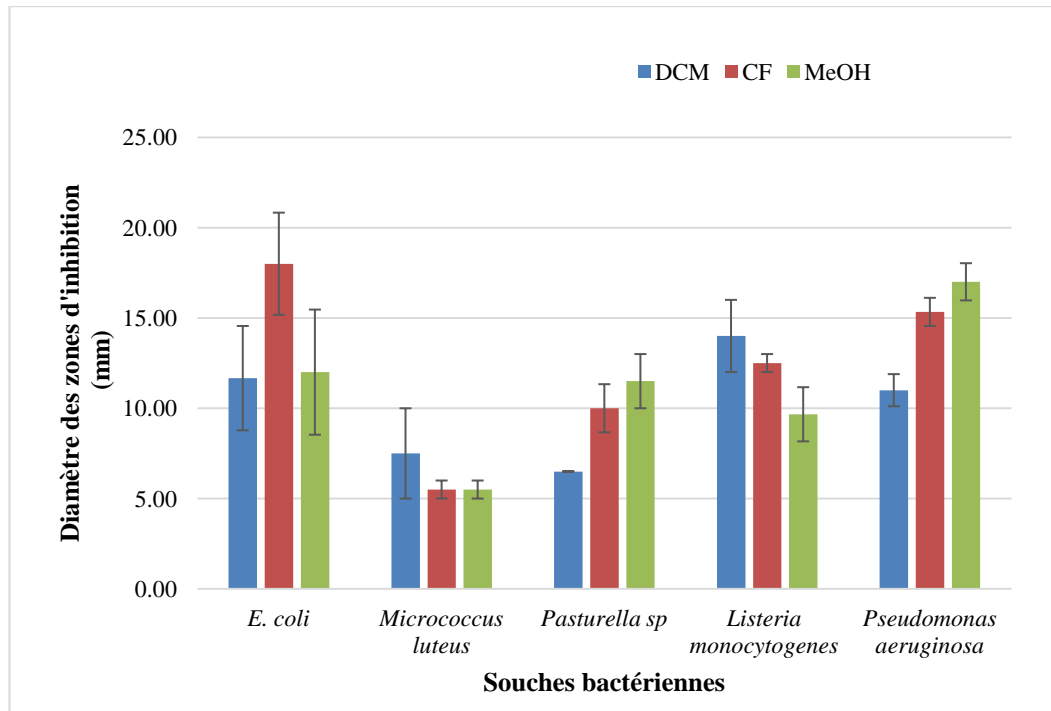


Figure 22 : Activité antibactérienne des différents extraits d'*Euphorbia guyoniana*

Il ressort de la figure 22 que l'action inhibitrice de la croissance bactérienne la plus importante est enregistrée pour l'extrait CF d'*Euphorbia guyoniana* sur *E. coli* avec une zone d'inhibition égale à $18,00 \pm 2,83$ mm et l'extrait MeOH sur *Pseudomonas aeruginosa* avec un diamètre de l'ordre de $17,00 \pm 1,03$ mm. Les autres souches présentent une sensibilité intermédiaire vis-à-vis à tous les extraits. La souche la plus résistante est *Micrococcus luteus* (Fig. 22).

Les composés phénoliques tels que les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins interviennent dans le mécanisme de défense de la plante contre les micro-organismes. La position et le nombre de groupement hydroxyle sur les composés phénoliques augmentent la toxicité contre micro-organisme (COWAN.1999). La méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité antibactérienne influe aussi sur les résultats l'activité antimicrobienne (NATARAJAN et al., 2005 ; FAZELI et al., 2007).

il est nécessaire de signaler que le produit actif qui se présente dans la plante peut être : soit actif sans être métabolisé et aura ainsi une activité *in vitro* et *in vivo*; soit actif après métabolisation et dans ce cas il sera inactif *in vitro* mais actif *in vivo* (BALANSARD, 2007). La période de la récolte, la méthode d'extraction et l'organe utilisé ont une grande influence

sur la composition chimique de la plante et par conséquent sur les activités biologiques (BALANSARD, 2007).

Il a été aussi rapporté que les composés responsables de l'action antibactérienne semblent vraisemblablement être les terpénoïdes, qui sont les composés principaux de la fraction apolaire des extraits des plantes (FERNANDEZ-LOPEZ *et al.*, 2005). Ceci pourrait expliquer la modeste activité de nos extraits polaires et l'action remarquable de l'extrait chloroformique.

Plusieurs travaux ont mis en évidence la grande sensibilité des bactéries Gram + par rapport aux Gram – vis-à-vis des extraits des plantes (Falleh *et al.*, 2008 ; Hayouni *et al.*, 2007 ; Turkmen *et al.*, 2007 ; Shan *et al.*, 2007 ; Koné *et al.*, 2004). La paroi cellulaire des bactéries à Gram positives est constituée d'une seule couche, alors que la paroi cellulaire des bactéries à Gram négatives a une structure multicouche liée par une membrane cellulaire externe (Ali-Shtayeh *et al.*, 1998). Les bactéries Gram (-), indépendamment de la membrane des cellules, possèdent une couche additionnelle à la membrane externe, qui se compose des phospholipides et des protéines, cette membrane est imperméable à la plupart des molécules. (Georgantelis *et al.*, 2007). L'hypersensibilité de la souche *Staphylococcus aureus* peut s'expliquer probablement par la sensibilité des bactéries Gram (+) aux changements environnementaux externes, tels que la température et les extraits naturels dus à l'absence de la membrane externe (Balentine *et al.*, 2006).

L'activité antibactérienne peut être expliquée par le mécanisme de toxicité vis-à-vis des microorganismes, qui se fait soit par des interactions non spécifiques telles que l'établissement des ponts hydrogènes avec les protéines des parois cellulaires ou les enzymes, soit par la chélation des ions métalliques (tels que le fer) et l'emprisonnement des substances nécessaires à la croissance des bactéries (Karou *et al.*, 2005).

Conclusion

L'objectif de cette étude était d'évaluer les activités biologiques des différents extraits d'*Euphorbia guyoniana tithymalus* (*Euphorbia guyoniana* Boissier et Reuter) Klotzsch et Garcke. A cet effet, nous avons mis en évidence la présence de certains métabolites, la quantification des composés phénoliques et l'activité biologique des extraits de l'espèce choisie. Cette plante est endémique au Sahara septentrional de l'Algérie appartenant à la grande famille d'Euphorbiaceae.

La partie aérienne d'*Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut. a été récoltée dans la région de Oued N'sa à Guerrara, wilaya de Ghardaïa au printemps 2018. L'extraction est effectuée par macération (extraction solide-liquide) en utilisant trois solvants à polarité croissante (dichlorométhane, chloroforme et Méhanol). Les extraits obtenus sont concentrés par rotavapeur et les résidus secs sont redissouts dans l'eau/DMSO (5%).

La détermination des rendements d'extraction nous montre que l'extrait MeOH d'*Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut. a le rendement le plus élève (7%). Les résultats diffèrent selon le solvant d'extraction.

Le screening phytochimique, en tant qu'analyse qualitative, montre la richesse de l'extrait MeOH en métabolites secondaire comme tanins, flavonoïdes de type flavones flavones, coumarines, quinones libres, terpiénoïdes et stéroïdes en comparaison avec les autres extraits.

En ce qui concerne la quantification des différentes classes des composés phénolique (polyphénols totaux, flavonoïdes et acides phénols), nous constatons que l'extrait MeOH d'*Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut est le plus riche en ces composés Il ressort aussi de cette étude que les extraits les plus riches en composés phénoliques ($75,13 \pm 9,77$ mg EAG/g, $24,97 \pm 2,44$ mg ER/g, $5,12 \pm 0,90$ mg EAC/g respectivement) par rapport aux autres extraits.

Deux activités biologiques ont été évaluée, il s'agit de l'activité anti-oxydante et l'activité antibactérienne. Pour l'activité anti-oxydante, deux tests antioxydants sont utilisés (ABTS et DPPH). Les résultats obtenus montrent que l'extrait méthanolique est le plus efficace dans l'inhibition de radical cation ABTS^{•+} ($IC_{50}=165,08 \pm 12,24$ µg/ml) et le piégeage de DPPH ($IC_{50}=189,98 \pm 17,57$ µg/ml) en comparaison avec le Trolox. Cependant, cette activité reste faible en comparaison avec l'acide gallique.

Sur les cinq souches bactériennes utilisées dans cette étude, il apparaît que les extraits *Euphorbia guyoniana* ont un pouvoir antibactérien moyen.

Notre étude a montré que la plante médicinale l' *Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut . est très riche en différents composés et présente une bonne activité anti-oxydante la rendant bonne candidate pour être utilisée dans le domaine pharmaceutique.

D'autres recherches sont nécessaires et d'autres vertus thérapeutiques restent à dévoiler dans l'espoir de trouver, à cette plante, qui demeure peu étudiée, une place en pharmacologie moderne.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

- **Abudunia A ., 2018.** Etude phytochimique, screening biologique et Pharmacologique des fleurs de calendula arvensis.p199.
- **Adjanohoun E., Cusset G., Issa L., Keita A., Lejoly J., Weachter P., 1989.**Banque de données de Médecine traditionnelle et Pharmacopée(PHARMEL). Notice pour la récolte et l'entrée des données, Ed. A.C.C.T, Paris, 124 p.
- **Afanas'ev I.B., Dcrozsko A.I., Brodskii A.V., Kostyuk V.A., Potapovitch A.I., (1989).**Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. Biochemical pharmacology. 38(11):1763-1769.
- **Ahmed A.A., Gherraf N., El-Bassuony A. A., Rhuati S., Gad M. H., Ohta S., Hirata T., 2006.** Guyonianin A and B, Two Polyester Diterpenes from Algerian Euphorbia guyoniana. Natural Product Communications. 1. P: 273-279.
- **Anton R., Wichtl W., 2003.** Plantes thérapeutiques, tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Ed Tec et Doc. P23-33.
- **Ali-RACHEDI F., MERAGHNI S., TOUAIBIA N ., Sabrina M ., 2018.** Analyse quantitative des composés phénoliques d'une endémique algérienne Scabiosa Atropurpurea sub. Maritima L. Vol. 87. P15.
- **Aganga A. ., Mosase K. W., 2001.** Tannins content, nutritive value and dry matter digestibility of Lonchocarpus capussa, Ziziphus mucropata, Sclerocarya birrea, Kirkiaa cuminata and Rhus lancea seeds. Animal Feed Science and Technology, 91: 107-113.
- **Appendino G., Spagliardi P., Ballero M., Seu G., 2002.** Macrocyclicditerpenes from *Euphorbia hyberna L.* subsp. Insularis and their reaction with oxyphilic reagents Fitoterapia 73, 476–582.
- **Al-Fatimi M., Friederich U., Jenett-Siems K., 2005.** Cytotoxicity of plant used in traditional medicine in Yemen. Fitoterapia, 76: 355-358.
- **Aline oliveira da conceição., 2010.** Effet d'extraits de plantes médicinales sur différenciation cellulaire et le transport du calcium par les cellules syncytiotrophoblaste-like humaines. Thèse de doctorat de l'université du Québec à Montréal.
- **Barboni T., 2006.** Contribution de méthodes de la chimie analytique à l'amélioration de la qualité de fruits et à la détermination de mécanismes (EGE) et de risques d'incendie 101-102.
- **Bechlem., 2018.in Smara., 2014.** Thèse Doctorat Etude ethnobotanique et chimique d'*Euphorbia guyoniana Boiss. et Reut.*

- **Ben Amor B.,2008.** Maîtrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principes actifs ; texturation par détente instantanée contrôlée DIC. Thèse de doctorat en Génie des Procédés Industriels. Université de la Rochelle. France. pp. 187.
- **Benzahi K., 2001.** Contribution A L'étude Des Flavonoïdes Dans La Plante *Cynodondactylon -L* « Chiendent ». Mémoire De Magister. Université D'Ouargla, Algérie.
- **Berkal G ., Bouchama S .,2016.** Etude phytochimique et activités biologiques d'une plante médicinale : *Euphorbia characias L.*p95.
- **Boudiar T., Lakhal H., Khalfallah A., Kabouche A., Kabouche Z., Brouard I., Bermejo J., Bruneau C., 2010.** A new alkaloid and flavonoids from the aerial parts of *Euphorbia guyoniana*. Natural Product Communications, 5(1), 35-37.
- **Boumaza S ., 2018.** Evaluation de l'effet des extraits flavonoïques et des huiles essentielles d'*Euphorbia guyoniana* sur les bactéries pathogènes d'origine tellurique.p196 .
- **Berkal G.,Bouchama S., 2016.** Etude phytochimique et activités biologiques d'une plante médicinale *Euphorbia characias L.*p95.
- **Balansard G., 2007.** Analyse critique des protocoles pharmacologiques utilisés pour la recherche d'extraits et de substances pures d'origine végétale à propriétés Antibactérienne ou antiparasitaire. Revue ethnopharmacologie.42
- **Brice NADAL ., 2009.** Synthèse et évaluation de nouveaux agents de protection contre les rayonnements ionisants .p277. 199.
- **Bouchouka E ., 2016.** Extraction des polyphénols et étude des activités antioxydante et antibactérienne de quelques plantes Sahariennes. p162.
- **Bellakhdar J., 1997.** La pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires, Eds. Le Fennec, Ibis Press, Paris - Rabat, 764p.
- **Bellakhdar J., 1997.** La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle. Ibis Press.
- **Billing J., Sherman P. W., 1998.** Antimicrobial Functions of Spices: Why Some Like it Hot. Q. Rev. Biol, 73: 3-49.
- **Bruneton J., 1999.** Plantes toxiques végétaux dangereux pour l'homme et les animaux. 3eme edition. P: 290-303
- **Correia H et al., 2006.** Polyphenolic profile characterization of *Agrimonia eupatoria L.* by HPLC with different detection devices. Biomedical chromatography. 20: p. 8894.
- **Chaabi M., Freund-Michel V., Frossard N., Randriantsoa A., Andriantsitohaina R., Lobstein A., 2007.** Anti-proliferative effect of *Euphorbia stenoclada* in human airway smooth muscle cells in culture. J. Ethnopharmacology. 109 (1). P: 134-139.

- **Chhabra S.C., Mahunnah, R.L.A., 1994.** Plants used in traditional medicine by hayas of the kagera region, Tanzania. *J. Economic Botany*, 84 (2), p: 121-129.
- **Cowan M.M. , 1999.** Plants products as antimicrobial agents, *Clin. Microbiol. Rev.* 12 .564–582.
- **Chaouch N., 2001.** Etude Des Alcaloïdes Dans La Coloquinte *Colocynthis Vulgaris(L)* Schrad (Cucurbitacées) Région De Oued N'sa (Wilaya De Ouargla). Thèse De magister, Université Kasdi Merbah D'ouargla, Algérie, P 44.
- **Chehma A. , 2006.** Catalogue des plantes spontanées du Sahara septentrional algérien. mémoire de fin d'étude, biologie, Université Kasdi Merbah Ouargla, Algérie, 140 p.
- **Chehma A., Djebar M.R., 2008.** Les espèces médicinales spontanées du sahara septentrional algérien distribution spatio-temporelle et ethnobotanique. *Revue Synthèse* n0 17: 36-45.
- **De Abreu N. , Mazzafera P., 2005.** Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy, *Plant Physiol. Biochem.* 43, 241–248.
- **Deba F., Dang Xuan T., Yasuda V., Tawata S., 2008.** Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata* .*Food Control*, Vol. (19), page : 346.
- **Dohou N., Yamni K., Gmira N., Idrissi Hassani L.M., 2003.** Screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine *Thymelaealythroïdes*, *Bull. Soc. Bordeaux.* p142, 61-78.
- **El-Farargy A.F., 1991.** *Egypt J. Pharm. Sci.* 32, 625-632.
- **Engler., 1896 in Smara, O. 2014.** Etude ethnobotanique et chimique d'*Euphorbia guyoniana* Boissier & Reuter. Thèse de doctorat, phytochimie, Faculté des sciences, Université BADJI MOKHTAR Annaba, Algérie, 215 p.
- **Ertas A., Yilmaz M.A., Firat M., 2015.** Chemical profile by LC–MS/MS, GC/MS and antioxidant activities of the essential oils and crude extracts of two *Euphorbia species*. Vol. 29, No. 6, 529–534.
- **Esparza I., Salinas I., Santamaria C., Garcia-Mina J.M., Fernandez J.M., 2005.** Electrochemical and theoretical complexation studies for Zn and Cu with individual polyphenol. *Analytica Chimica Acta.* 543: 267–274.
- **Fazeli M. R., Amin G., Ahmadian-Attari M. M., Ashtiani H., Jamalifar H., Samadi, N., 2007.** Antimicrobial activities of Iranian sumac and avi-shan-e shirazi (*Zataria multiflora*) against some food -borne bacteria. *Food Control* 18: 646 -649.

- **Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdelly C., 2008.** Phenolic composition of *Cynara cardunculus L.* organs, and their biological activities. *C. R. Biologies*, 331: 372-379.
- **Fernandez-Lopez J., Zhi N., Aleson-Carbonell L., Perez-Alvarez J.A., Kuri V. 2005.** Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat Science*. 69: 371 -380.
- **Folo Lisele J., 2014.** Screening Chimique, Extraction Et Caracterisation Des Groupes Phytochimiques Des Plantes Traitant Les Maladies Cutanees Dans La Region De La Tshopo p12.
- **Florence J., 1997.** Flore de la Polynésie Française Cnabiaceae, Ceropiaceae, Euphorbiaceae, Moraceae. Vol. 1.
- **Jassbi A. R., 2006.** Chemistry and biological activity of secondary metabolites in *Euphorbia* from Iran. *Phytochemistry*. 67 (18). P : 1977-1984.
- **Jawad A., Langrish T.A.G., 2012.** Optimisation of total phenolic acids extraction from Mandarin peels using microwave energy: The importance of the Maillard reaction. *Journal of Food Engineering*. 109, 162-174.
- **Haba H., 2008.** Etude phytochimique de deux Euphorbiaceae sahariennes : *Euphorbia guyoniana Boiss. et Reut.* Et *Euphorbia retusa Forsk.*, Thèse de doctorat. Université El Hadj Lakhdar Batna. 287 pages.
- **Haba H., Lavaud C., Harkat H., Alabdul Magid., Marcourt. L., Benkhaled M., 2007.** 68 (9). Diterpenoids and triterpenoids from *Euphorbia guyoniana*. *J. Phytochemistry*. P: 1255-1260.
- **Haba H., Lavaud C. Marcourt L., Long C., Harkat H., Benkhaled M., 2009.** Entabietane diterpenoids from *Euphorbia guyoniana Boiss. & Reut.* *Biochemical Systematics and Ecology* XXX. P: 1-5.
- **Hadj Salem J., 2009.** Extraction, identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de *Nitraria retusa* et synthèse de dérivés acylés de ces molécules par voie enzymatique. p271
- **Hadjaiji-Benseghier F., Derridj A., 2013.** Relative importance of the exploitation of medicinal plants in traditional medicine in the Northeastern sahara. *Emir.J.Food Agric*. 25 (9): 657-665.
- **Hamia C., Guergab A., Rennane N., Birache M., Haddad M., Saidi M., Yousfi M., 2014.** Influence des solvants sur le contenu en composés phénoliques antioxydante des extraits du *Rhanterium adpressum* e t l'activité. Vol 6. 37.

- **Handa SS., Khanuja SPS., Longo G., Rakesh DD., 2008.** Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. International Centre for Science and High Technology.
- **Harborne J.B., 1998.** Textbook of Phytochemical Methods. A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis. 5th Edition, Chapman and Hall Ltd, London, 21-72.
- **Havsteen B. H., 2002.** The biochemistry and medical significance of the flavonoïds. Pharmacology & Therapeutics. 96 P: 67- 202.
- **Herbert R.B., 1989.** The Biosynthesis of secondary metabolites. 2éme edition Chapman and Halle p 2, 11-115.
- **Hernandez T., Canales M., Avila J. G., Duran A., Caballero J., Romo Devivar A., LIRA R., 2003;** Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán De Las Salinas (Mexico); Journal of Ethnopharmacology, Vol. 88 (2): 181- 188.
- **Hegazy M.E.F., Mohamed A.H., Aoki N., Ikeuchi T., Ohta E., Ohta S., 2010.** Bioactive jatrophane diterpenes from *Euphorbia guyoniana*. Phytochemistry, 71, 249-253
- **Hynes M.J., O’Coinceanainn M., 2001.** The kinetics and mechanisms of the reaction of iron(III) with gallic acid, gallic acid methyl ester and catechin. Journal of Inorganic Biochemistry. 85: 131–142
- **Ghedira K., 2005.** Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. Phytothérapie 3, 162-169.
- **Green RJ, 2004.** Antioxidant activity of peanut plant tissues.
- **Gubb A. S., 1913.** La flore Saharienne: Un aperçu photographique, Ed. Adolphe Jourdan, Alger, 129 p.
- **Galvez C.J., Martin-Cordero., Houghton A.M.,2005.** Antioxidant Activity of methanol extracts obtained from Plantago species, J. Agric. Food Chem. 53.
- **Karharo., 1974.** Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie
- **Kassing M., Jenelten U., Schenk J., Strube J., 2010.** A new approach for process development of plant-based extraction processes. Chemical Engineering & Technology 33 (3), 377-387.
- **Kemassi A., Boukhari K., Cherif R., Ghada K., Bendaken N, Bouziane N., Boual Z., Bouras N., Ould Elhadj-Khelil A., Ould Elhadj M.D.,2015.** Evaluation de l’effet larvicide de l’extrait aqueux d’*Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut. 44 – 61.
- **Kemassi ., 2014.** Toxicité comparée des extraits d’*Euphorbia guyoniana* (Stapf.) (Euphorbiaceae), *Cleome arabica* L. (Capparidaceae) et de *Capparis spinosa* L. (Capparidaceae) récoltés de la région de Ghardaïa (Sahara septentrional) sur les larves du

cinquième stade et les adultes de *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775) (Orthoptera Cyrtacanthacridinae) thèse de doctorat en Écologie Saharienne et Environnement, université de Kasdi Merbah-Ouargla,: 857-860.

- **Khelil A., 2017.** Synthèse par réaction de Biginelli d'hybrides de coumarines et du donepezil potentiellement actifs contre la maladie d'alzheimer. Université Mouloud Mammeri De TiziOuzou Faculte des Sciences Departement de Chimie
- **Le floch ., 1983 .** Contribution à une Etude Ethnobotanique de la Flore Tunisienne. Editions Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique, Tunisie, 39-40.
- **Lee K.W ., Kim Y.J., Lee H.J., Lee C. Y., 2003.** Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. J. Agric. Food Chem, 51, 7292-7295
- **Li B., Wang X., Chen R., Weiguo Huangfu W., Xie G.V., 2008.** Antibacterial activity of chitosan solution against *Xanthomonas* pathogenic bacteria isolated from *Euphorbia pulcherrima*. Carbohydrate Polymersm, Vol. 72: 287–292 .
- **Li W. C., 2007.** Endophytic fungi associated with lichens in Baihua mountain of Beijing, China. Fungal Diversity; 25: 69-80.
- **Lima E., Medeiros J., Davin L., 2003.** Triterpènes pentacycliques d'*Euphorbia stygiana*. Phytochimie, 63, 421 - 425.
- **Lhuillier A et al., 2007.** Comparison of flavonoid profiles of *Agauriasalicifolia* (Ericaceae) by liquid chromatography-UV diode array detection-electrospray ionisation mass spectrometry. Journal of Chromatography A. 1160(1-2): p. 13-20.
- **Mahmoudi S., Coll., 2012.** Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut *Cynara scolymus l.*
- **Manga H., Brick D., Marie D., Quetin-Leclercq J., 2004.** In vivo anti-inflammatory activity of *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae). Journal of Ethnopharmacology. 92 (2-3), P: 209-214.
- **Mavar M. H., Brick D., Marie D., Quetin-Leclercq J., 2004;** In vivo antiinflammatory activity of *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) (Euphorbiaceae) ; Journal of Ethnopharmacologym, Vol. 92 (2-3): 209-214
- **Maire R., 1933.** Études sur la flore et la végétation du Sahara central. Mémoire de la société d'histoire naturelle de l'Afrique du nord. Mission du Hoggar II, Alger, 361 p.
- **Maiza K., Brac De La Perriere R.A., Hammiche V., 1993.** Pharmacopée traditionnelle saharienne : Sahara septentrional.169-171.

- **Maiza, K., Hammiche, V, Bounaga, N., Brac de la Perrière, R.A. 1992.** Inventaire des plantes médicinales de trois régions d'Algérie. Actes du Colloque International hommage à Jean Pernès: Complexes d'espèces, flux de gènes, ressources génétiques des plantes. Paris, pp. 631-633.
- **Manolov, I., Danchev, N.D., Eur. J. Med. Chem. 1995.** 30, 531- 536.
- **Miller N.J., Diplock A.T., Rice-Evans C., Davies M.J., Gopinathan V., Milner A., 1993.** A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. Clin. Sci., 84, 407–412.
- **Mohammedi Z., Atik F., 2011.** Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *Tamarix aphylla (L.) karst.* Inter. J. Pharma. Bio. Sci. Vol. 2. pp. 609-615.
- **Mohammedi., 2006.** Etude de pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen.thèse de magister en biologie option Produits naturels , activités biologiques et synthèse .Université Abu Bakr Belkaid, Tlemcen p18.
- **M'hiri N., 2015.** Etude comparative de l'effet des méthodes d'extraction sur les phénols et l'activité antioxydante des extraits des écorces de l'orange « Maltaise demi sanguine » et exploration de l'effet inhibiteur de la corrosion de l'acier au carbone p 205, 31.32.
- **Murota K., Mitsukuni Y., Ichikawa M., Tsushida T., Miyamoto S., et Terao J., 2004.**Quercetin-4'-glucoside is more potent than quercetin-3-glucoside in protection of rat intestinal mucosa homogenates against iron ion-induced lipid peroxidation. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52(7): 1907-1912.
- **Natarajan et al., 2005. In. Herouini A., Kemassi A., Ould El Hadj M.D., 2015 .** Etude de l'activité biologique des extraits aqueux d'*Euphorbia guyoniana* (Euphorbiaceae) récoltée dans Oued Sebseb (Sahara Algérien) Vol.8. 15 – 25.
- **Naczk M., Shahidi F., 2004.** Extraction and analysis of phenolic in food. Journal of chromatography.95-111.
- **Néve J., 2002.** Modulation de l'apport alimentaire en anti-oxydants Optimisation of dietary intake of anti-oxidants. Nutrition clinique et métabolisme. 16. P : 292-300
- **Norhanom A.W., Yadav M., 1995.** Tumour promoter activity in Malaysian Euphorbiaceae. British Journal of Cancer, 71: 776-779.
- **Ould El Hadj M.D., Hadj-Mahmmed M., Zabeirou H., 2003.-** Place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région de Ouargla (Sahara septentrionale est) Courrier du Savoir-N°03, 47-51.

- **Öksüz S., Ulubelen A., Barla A., Voelter W., 2002.** Turk. J. Chem. 26: 457-463.
- **Ozenda P., 1983.** Flore du Sahara. Ed, CNRS, Paris, 626 p.
- **Ozenda P., 1991.** Flore et végétation du Sahara. 3eme édition. CNRS Paris.
- **Popovici C., Saykova I., Tylkowski B., 2009.** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénolique par la réactivité avec le radical libre DPPH.p25-39.
- **Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M., 2001.** Antioxydant in food practical applications.p108-109.
- **Podsedek., 2007; Falleh et al., 2008 in BOUMAZA S.,2018.** Evaluation de l'effet des extraits flavonoïques et des huiles essentielles d'*Euphorbia guyoniana* sur les bactéries pathogènes d'origine tellurique. p169. 66
- **Quenzel, P., Santa S., 1963.** Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed. CNRS, Paris, 1170 p.
- **Quezel P., 1962.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Vol. 1-2. Paris.
- **Quy Diem Do et al., 2014 in Lehout R., Laib M., 2015.** Comparaison de trois méthodes d'extraction des composés phénoliques et des flavonoïdes à partir de la plante médicinale : *Artemisia herba alba*. p 76, 42.
- **Rached W., 2009.**évaluation du potentiel antioxydant de plantes médicinales et analyse phytochimique. P173.
- **Rédei, D., Hohmann J., Evanics F., Forgo P., Szabo P., Mathe I., 2003.** Isolation and structural characterization of new, highly functionalized diterpenes from *Euphorbia serrulata*. Helv. Chim. Acta 86, 280–289
- **Rice-Evans C., Miller N. J., 1994.** Methods Enzymol., 234, 279-293.
- **Rice-Evans C., Miller N. J., Bowell P. G., Bramley P. M., Pridham J. B., 1995.** Free Radical Res., 22,375-383. Rached W.2009.évaluation du potentiel antioxydant de plantes médicinales et analyse phytochimique. P173.
- **Rice-Evans C., Miller N., Paganga G.,1997.**Antioxydant properties of phenolic compounds. Trends in plant science,2,152-159.
- **Santa S., 1963.**Nouvelle Flore de l'Algerie et des regions Desertiques Meridionales, 1.2, 801-802.
- **Shi H.M., Long B. S., Cui X. M., Min Z. D., 2005.** new bisabolane sesquiterpenoid from *Euphorbia chrysocoma*. J. Asian Nat. Prod. Research, 7 (6). P: 857-860.
- **Schulte R. E., 1987.** Members of *Euphorbiaceae* in primitive and advanced societies. Botanical Journal of Linnean Society. P: 94, 77-96

- **Shi JG., Shi YP., Jian ZJ., 1997.** Sesquiterpénoïdes d'*Euphorbia wangii*. *Phytochimie*, 45, 343 - 347.
- **Shui G., Leong L., 2006.** Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. *Food Chemistry*. 97. 277-284.
- **Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M., 1999.** "Analysis of total phenols and other oxidant substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent" *Methods Enzymol.*, Vol 299, p152.
- **Singla, A.K., et Pathak, K., 1990.** Phytoconstituents of *Euphorbia* species. *Fitoterapia*, LXI (6), 483-516
- **Smara O., 2014.** Etude ethnobotanique et chimique d'*Euphorbia guyoniana Boissier & Reuter*. Thèse de doctorat, phytochimie, Faculté des sciences, Université BADJI MOKHTAR Annaba, Algérie, 215 p.
- **Sun B., Ricardo-Da-Silva J., Spranger I., 1998.** Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J Agric. Food Chem*, 46 (10), 4267-4274.
- **Szauffer-Hajdrych M., Goślińska O., 2004.** The quantitative determination of phenolic acids and antimicrobial activity of *Symphoricarpos albus (L.) Blake*. Jan-Feb;61(1):6974
- **Tanaka T et al., 1999.** Identification of cohesin association sites at centromeres and along chromosome arms. *Cell* 98(6):847-58.
- **Torreggiani A., Tamba M., Trincherio A., Bonora S. 2005.** Copper(II)–Quercetin. complexes in aqueous solutions : spectroscopic and kinetic properties. *Journal of Molecular Structure*. 744–747.(SPEC. ISS.) 759-766.
- **Tiwari P., Kumar B., Kaur M., Kaur G., Kaur H., 2011.** Phytochemical screening and extraction.
- **Treaser E., Evans W.C., 1987.** *Pharmacognosie, Billiaire Tindall*. 13 th edition. London 61-62.7.
- **Vansant., 2004.** Radicaux libres et antioxydants : principes de base. EdInstitut Danone.
- **Webster G.L., 1987.** The saga of the spurge: à review of classification and relationships in the Euphorbiales. *Botanical Journal of Linnean Society*. P: 94, 3-44.
- **Wojdyło A., Oszmiański J., Czemerys R., 2007.** Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry* 105: 940–949.
- **Zam W., Bashour G., Wassim K., 2012.** Effective extraction of polyphenols and proanthocyanidins from Pomegranate's peel. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 4. 675-682.
- **Zeghad., 2009.** <https://bu.umc.edu.dz/theses/biologie/ZEG7208.pdf>.

- **Zerrouki N.,2009.**Contribution à l'étude phytochimique de la plante tetraclinis articulata activité biologique et biochimique de la plante.

Webographie

1. Catalogue of life 2019
<http://www.catalogueoflife.org/annualchecklist/2019/details/species/id/b88c0d9dac02a6c0c8f80d41f70d25ec>
2. Base de données des plantes d'Afrique
<https://www.village.ch/musinfo/bd/cjb/africa/details.php?langue=fr&id=143100>
3. Begaa 2019 ;Taous 2018 ;Ouzina 2018 ;Atlas-sahara
<http://atlas-sahara.org/Euphorbiaceae/Euphorbia%20guyoniana/Euphorbia%20guyoniana.html?cat=Euphorbiaceae>.
4. Biodiversité végétale du sud-ouest marocain
<https://www.teline.fr/fr/photos/euphorbiaceae/euphorbia-guyoniana#photo-10>.
5. Cartes d'Algérie <https://www.algerieprofonde.net/algerie/cartes-dalgerie/>
6. Chimactive. Détermination de l'activité d'un antioxydant par le test DPPH
<http://chimactiv.agroparistech.fr/fr/aliments/antioxydant-dpph/principe>

Annexes

Annexes 01 : Equipements et appareils utilisé durant l'étude.



A : Broyeur



B : Rotavapor Heidolph.Laborota 4000
efficient



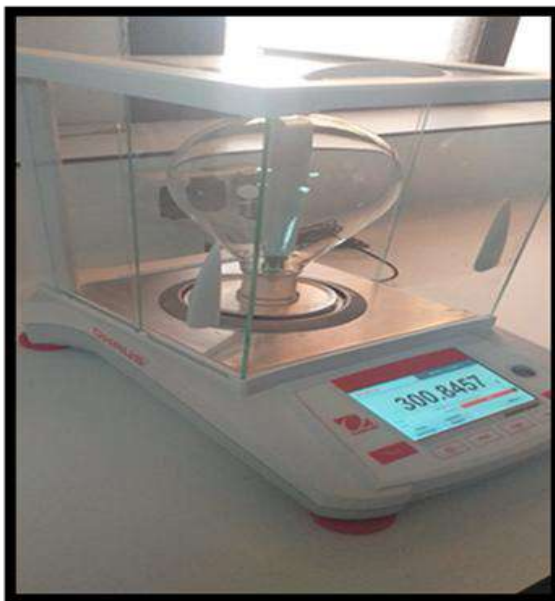
C: Etuve Memmert GmbH + Co. KG



D :Réfrigérateur



E : Spectrophotomètre UV-Visible
Technologie Split Beam - UV-1280.



F :Balance Analytique



G : agitateur avec température



H : Bac benzène



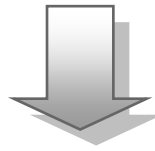
I : Bain-marie WNB/WNE/WPE.



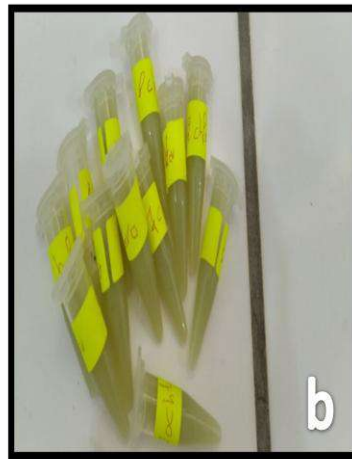
J : autoclave

Annexes 2 : étapes d'extraction liquide-solide d'*Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut.

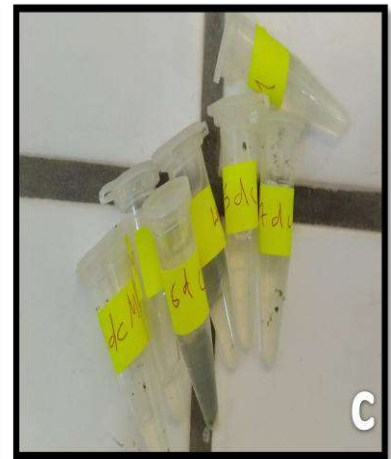




a : extrait de MeOH



b : extrait de CF



c : extrait de DCM

Annexes 3 : Réactifs chimique utilisé pour le Criblage phytochimique d'Euphorbia
guyoniana Boiss. & Reut.

Réactifs chimiques	Utilisation
<ul style="list-style-type: none"> – Chlorure de fer (FeCl₃) (1%). – Réactif de Stiasny. 	Criblage des tanins
<ul style="list-style-type: none"> – Acide chlorhydrique HCl (2N). – Hydroxyde d'ammonium (NH₄OH). – Ethanol chlorhydrique. – Copeaux – magnésium (Mg). – Alcool isoamylique (3-méthylbutan-1ol , C₅H₁₂O). 	Criblage des flavonoïdes
<ul style="list-style-type: none"> – Hydroxyde de sodium (NaOH) (10%). 	Criblage des coumarines
<ul style="list-style-type: none"> – Hydroxyde de sodium (NaOH) (1%) 	Criblage des Quinones libres.
<ul style="list-style-type: none"> – Acide chlorhydrique HCl (1%). – Réactif de Mayer. – Réactif de Wagner. 	Criblage alcaloïdes
<ul style="list-style-type: none"> – L'anhydride acétique(C₄H₆O₃). – Acide sulfurique(H₂SO₄) – Chloroforme /trichlorométhane (CHCl₃) 	Criblage des Terpénoïdes.

<ul style="list-style-type: none"> - L'anhydride acétique(C₄H₆O₃). - Acide sulfurique(H₂SO₄). 	Criblage des stéroïdes
<ul style="list-style-type: none"> - Liqueur de Fehling. - L'eau distillée. 	Criblage des composés réducteurs.

Annexes 4 : criblage phytochimique des extraits d'Euphorbia guyoniana Boiss. & Reut.

1. Tanins



Les extraits CF, DCM, MeOH

2. Flavonoïdes



a. Anthocyanes

Les extraits CF, DCM, MeOH .



b. Réaction à la cyanidine

Les extraits CF, DCM, MeOH.

3. Quinones libres



Les extraits CF, DCM, MeOH.

4. Alcaloïdes



Réactif de Wagner

Les extraits 1, 2, 3 chf, DCM, MeOH.



Réactif de mayer

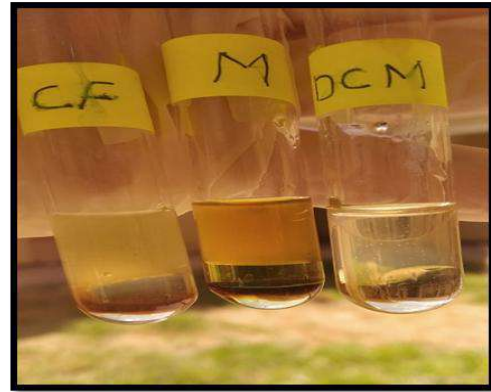
Les extraits 1, 2, 3 chf, DCM, MeOH.

5. Terpénoïdes



a. Test de Libermann-Burchard

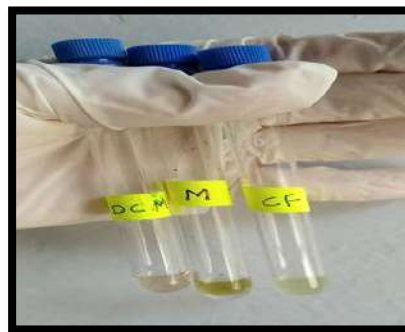
les extraits CF, DCM, MeOH



b. Réaction chloroformique

Les extraits CF, DCM, MeOH

7. Stéroïde



Les extrait CF, DCM, MeOH

9. Composés réducteurs



Les extraits CF, DCM, MeOH

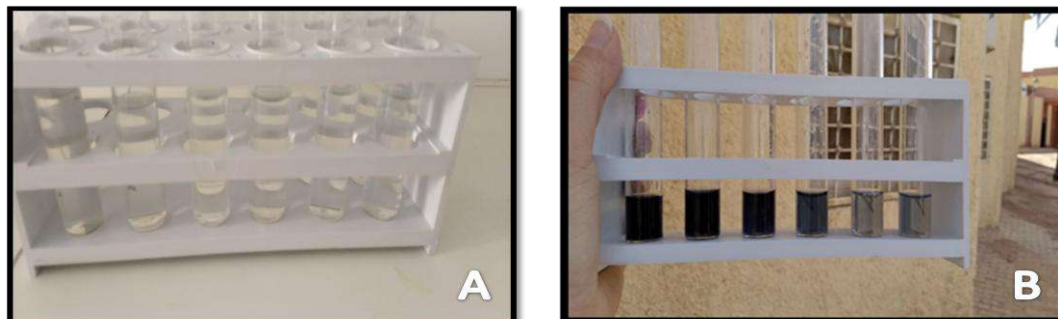
**Annexes 5 : Réactifs chimique utilisé pour le dosage des composés phénoliques
d'Euphorbia guyoniana Boiss. & Reut**

Réactifs chimiques	Utilisation
<ul style="list-style-type: none"> _ l'extrait CF, DCM, MeOH _ Acide gallique (acide 3, 4, 5trihydroxybenzoïque). _ Réactif Folin-Ciocalteau. _ Eau distillée. _ Carbonate de sodium (Na₂CO₃ 7,5 %). 	Dosage des polyphénols totaux
<ul style="list-style-type: none"> _ l'extrait CF, DCM, MeOH _ rutine(C₂₇ H₃₀ O₁₆). _ Eau distillée. _ Nitrite de sodium (NaNO₂) (5%). _ Chlorure d'aluminium (AlCl₃) (10%). _ Hydroxyde de sodium (NaOH) (1 M). 	Dosage des flavonoïdes
<ul style="list-style-type: none"> _ l'extrait CF, DCM, MeOH _ Acide caféique (C₉H₈O₄). _ Eau distillée. _ HCl (0,5 M). _ Réactif d'Arnov. _ Nitrite de sodium(NaNO₂) (10%). _ Hydroxyde de sodium (NAOH) (1 M). 	Dosage des acides-phénols.

Annexes 6 : Dosage des polyphénols totaux des extraits d'*Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut.

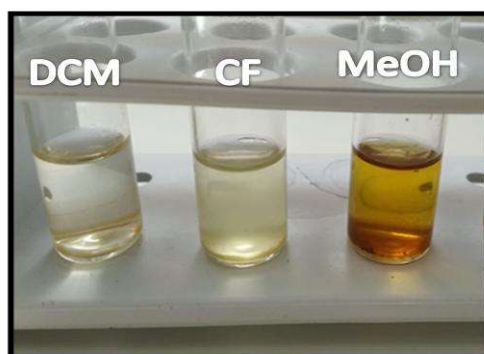
A : Série de dilution de l'Acide gallique (0-800 μ g/ μ l).

B : Dosage des polyphénols totaux établis avec l'acide gallique.



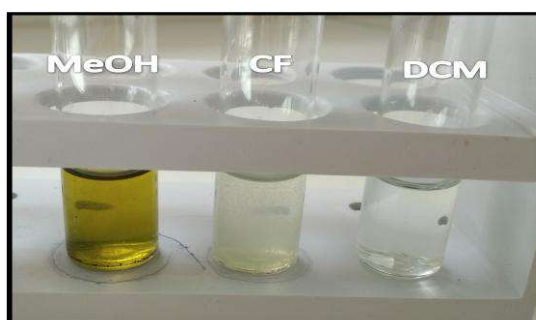
Annexes 7: Dosage des flavonoïdes des extraits d'*Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut.

Dosage des flavonoïdes établis avec les extrais MeOH, CF,DCM.



Annexes 08 : Dosage des acides phénols des extraits d'*Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut.

Dosage des acides phénols établis avec les extrais MeOH, CF,DCM



Annexes 09 : Réactifs chimique utilisé pour l'activité antioxydant d'Euphorbia guyoniana
Boiss. & Reut

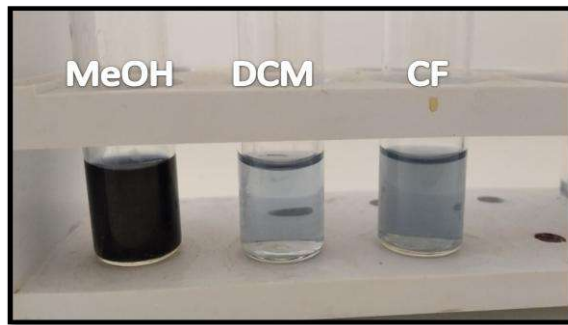
Réactifs chimiques	Utilisation
L'extrait MeOH, DCM ,CF Solution d'ABTS Persulfat de potassium $k_2 S_2 O_8$ Ethanol Trolox L'acide gallique	Test de ABTS
L'extrait MeOH, DCM ,CF Solution de DPPH Méthanol Trolox L'acide gallique	Test de DPPH

Annexes 10: teste ABTS des extraits d'Euphorbia guyoniana Boiss. & Reut

Série de dilution de l'acide gallique avec ABTS

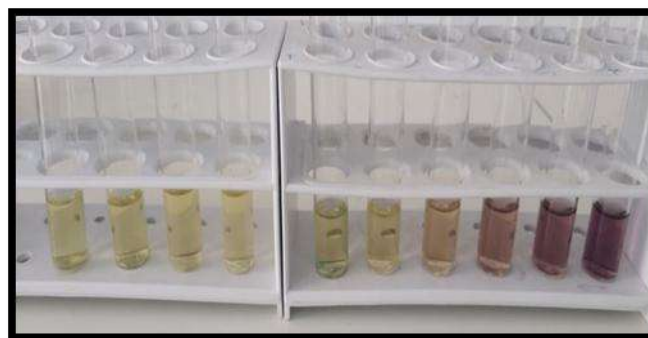


Test d'ABTS établis avec les extrais MeOH, CF,DCM

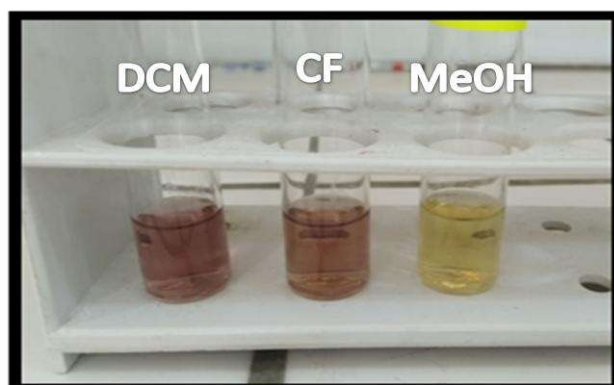


Annexes 11 : teste DPPH des extraits d'Euphorbia guyoniana Boiss. & Reut

Série de dilution de l'acide gallique avec DPPH



Test DPPH établis avec les extrais MeOH, CF,DCM

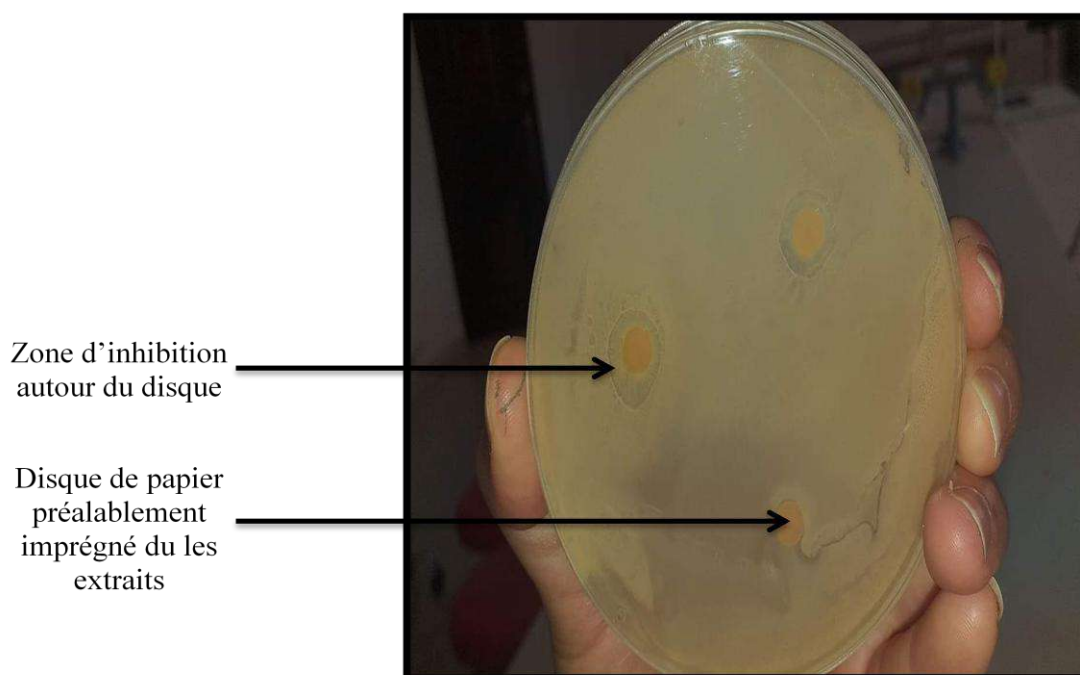


Annexes 12: Méthode de diffusion en disque sur milieu gélosé Müller Hinton.



Milieu Müller Hinton.

Zone d'inhibition autour des disque contenant les extraits (MeOH,DCM ,CF) à tester vis-à-vis d'*E.coli*



Zone d'inhibition
autour du disque

Disque de papier
préalablement
imprégné du les
extraits

Zone d'inhibition autour des disque contenant les extraits (MeOH,DCM ,CF) à tester vis-à-vis différents micro bactériennes



Pseudomonas aeruginosa



Micrococcus luteus



Pasturella sp



Listeria monocytogene

Activités biologiques des différents extraits d'*Euphorbia guyoniana* Boss. & Reut.

Résumé

Le présent travail est porté sur l'évaluation des activités biologiques des différents extraits (MeOH, CF et DCM) d'une espèce endémique du Sahara Algérien, il s'agit d'*Euphorbia guyoniana* Boss & Reut. L'extraction est effectuée par macération solide-liquide de la poudre de la partie aérienne de cette espèce en utilisant trois solvants de différentes polarités. Le criblage phytochimique de ces extraits a mis en évidence la richesse de l'extrait méthanolique en quelques métabolites (tanins, flavonoïdes, coumarines, quinones libres, terpénoïdes et stéroïdes). La quantification des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des acides phénols a été effectuée par des méthodes colorimétriques appropriées. Les résultats obtenus montrent que l'extrait de MeOH a les teneurs les plus élevées en ces composés qui est de l'ordre de 75,13±9,77 mg EAG/g, 24, 97±2,44 mg ER/g et 5,12± 0,90 mg EAC/g respectivement. Deux activités biologiques ont été évaluées, à savoir l'activité anti-oxydante via deux tests (ABTS et DPPH) et l'activité antibactérienne sur cinq souches bactériennes (*E. coli*, *lysteria monocytogene* ATCC 13932, *pseudomonas aerogenosa* ATCC 9027 et *pasturella sp*, *microcuccuss luteus* ATCC 9314) par diffusion sur milieu gélosé. En ce qui concerne l'activité anti-oxydante, l'extrait de MeOH a le pouvoir antioxydant le plus puissant dans l'inhibition de radical cation ABTS^{•+} et le piégeage de radical DPPH avec des valeurs d'IC₅₀ égales à 165,08±12,24 µg/ml et 189,98±17,57 µg/ml respectivement en comparaison avec l'antioxydant standard (le Trolox). Pour l'activité bactérienne, il apparait que les différents extraits d'*Euphorbia guyoniana* présentent une activité antibactérienne moyenne. En conclusion, *Euphorbia guyoniana* est riche en certains métabolites et présente une bonne activité anti-oxydante, ce qui peuvent justifier son utilisation en médecine traditionnelle.

Mots clés : *Euphorbia guyoniana*, différents extraits, composés phénoliques, activité anti-oxydante, activité antibactérienne.

Biological activities of the different extracts of *Euphorbia guyoniana* Boss. & Reut.

Abstract

This work focused on the evaluation of biological activities of different extracts (MeOH, CF and DCM) of an endemic species from Algerian Sahara; it is *Euphorbia guyoniana* Boss & Reut. The extraction was carried out by solid-liquid maceration of aerial part powder of this species using three solvents of different polarities. The phytochemical screening of these extracts demonstrated the richness of the methanolic extract in a few metabolites (tannins, flavonoïds, coumarins, free quinones, terpenoids and steroids). The quantification of total polyphenols, flavonoids and phenol acids was performed by appropriate colorimetric methods. The obtained results showed that the MeOH extract had the highest contents of these compounds, which were 75.13 ± 9.77 mg EAG/g, 24.97 ± 2.44 mg ER/g and 5.12 ± 0.90 mg EAC/g respectively. Two biological activities were evaluated: antioxidant activity via two tests (ABTS and DPPH) and antibacterial activity on five bacterial strains (*E. coli*, *Listeria monocytogene* ATCC 13932, *Pseudomonas aerogenosa* ATCC 9027, *Pasturella sp*, *Microcuccuss luteus* ATCC 9314) by diffusion on agar medium. Regarding to antioxidant activity, MeOH extract exhibited the most potential antioxidant power in inhibiting ABTS^{•+} cation radicals and DPPH radical scavenging with IC₅₀ values equal to 165.08 ± 12.24 µg/ml and 189.98 ± 17.57 µg/ml respectively in comparison with the standard antioxidant (Trolox). For bacterial activity, it appears that the different extracts of *Euphorbia guyoniana* have moderate antibacterial activity. In conclusion, *Euphorbia guyoniana* is rich in certain metabolites and exhibits a good antioxidant activity, which may justify its use in traditional medicine.

Keywords: *Euphorbia guyoniana*, different extracts, phenolic compound, antioxidant activity, antibacterial activity.

الانشطة البيولوجية لمختلف المستخلصات لنبات *Euphorbia guyoniana* Boss. & Reut

الملخص

يركز هذا العمل على تقييم الانشطة البيولوجية للمستخلصات المختلفة (MeOH, CF, DCM) لأنواع المستوطنة في الصحراء الجزائرية، وهي *Euphorbia guyoniana* Boss & Reut. يتم الاستخراج عن طريق النقع الصلبة- السائلة لمسحوق الجزء الجوي من هذا النوع باستخدام ثلاثة مذيبات ذات أقطاب مختلفة. أظهر الفحص الكيميائي النباتي لهذه المستخلصات ثراء المستخلص الميثانولي في بعض من المستقلبات (التانينات، الفلافونويد، الكومارين، الينونات الحرة، التربينويدات، الستيريديتات). تم إجراء القياس الكمي لمجموع البوليفينول والفلافونويد وأحماض الفينول بطرق قياس لونية مناسبة. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن المستخلص MeOH يحتوي على أعلى محتويات من هذه المركبات والتي تتراوح من 75,13±9,77 mg EAG/g 24, 97±2,44; mg ER/g 5,12± 0,90 ; mg EAC/g على التوالي. تم تقييم نشاطين بيولوجيين هما النشاط المضاد للأكسدة من خلال إختيبارين (DPPH و ABTS) والنشاط المضاد للبكتيريا على خمس سلالات بكتيرية (*listeria monocytogene* (ATCC 13932), *pseudomonas aerogenosa* (ATCC 9027), *E. coli microcuccuss luteus* (ATCC 9314), *pasturella sp* طريق الانتشار على وسط أجار. فيما يتعلق بنشاط مضادات الأكسدة، يحتوي مستخلص MeOH على أقوى قوة مضادة للأكسدة في تثبيط $ABTS^{++}$ الجذور الكاثيونية وكسح جذور DPPH بقيم IC_{50} تساوي $165,08 \pm 12,24 \mu g/ml$ ولجذر DPPH $189,98 \pm 17,57 \mu g/ml$ بالمقارنة مع مضادات الأكسدة القياسية (ترولوكس). بالنسبة للنشاط البكتيري يبدو أن المستخلصات المختلفة من *Euphorbia guyoniana* لها نشاط معتدل مضاد للجراثيم. في الختام، يعتبر *Euphorbia guyoniana* غنيا ببعض المستقلبات ويظهر نشاطا جيدا مضادا للأكسدة، مما قد يبرر استخدامه في الطب التقليدي.

الكلمات المفتاحية: *Euphorbia guyoniana*, مستخلصات مختلفة، مركبات فينولية، نشاط مضاد للأكسدة، نشاط مضاد للجراثيم.