

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

BADJI MOKHTAR- ANNABA UNIVERSITY

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR- ANNABA



جامعة باجي مختار - عنابة

Année 2017/2016

Faculté des Sciences
Département de Chimie

THESE

Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat

Option : Synthèse et développement des molécules bioactives

THEME

Etude phytochimique et évaluation de
quelques propriétés biologiques de trois
espèces de l'*Euphorbia*

Par :

M. elle ZAKKAD Farida

Devant le jury :

Président :	Mr. AOUF Nour eddine	Prof.	Université d'Annaba
Rapporteur :	Mr. DJILANI Salah eddine	Prof.	Université d'Annaba
Examineurs :	Mr. NASRI Hichem	Prof.	Université d'El Tarf
	Mme. BERREDJEM Malika	Prof.	Université d'Annaba
	Mme. FERCHICHI Loubna	M.C.A	Université d'Annaba

*Etude phytochimique et évaluation de quelques propriétés
biologiques de trois espèces de l'Euphorbia*

ZAKKAD Farida

SOMMAIRE

	PAGE
REMERCIEMENTS	i
ملخص	iii
ABSTRACT	iv
RESUMÉ	v
ABRÉVIATIONS	vi
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES FIGURES	vii
<hr/>	
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
<hr/>	
- PREMIERE PARTIE - SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
CHAPITRE -I- LES MÉTABOLITES SECONDAIRES	4
<hr/>	
I.1. Introduction	4
I.2. Définition	4
I.3. Classification	5
CHAPITRE - II- LES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES	6
<hr/>	
II.1. Biosynthèse	6
II.2. Activités biologiques des polyphénols	7
II.3. Classification des polyphénols	9
II.3.1. Acides phénoliques	9
II.3.2. Coumarines	10
II.3.3. Tanins	11
II.3.4. Flavonoïdes	13
II.3.4.1. Structure et origine	13
II.3.4.2. Biosynthèse	14
II.3.4.3. Classification	16
II.3.5. Relation structure-activité antioxydante des flavonoïdes	20
CHAPITRE - III - LES COMPOSÉS TERPÉNIQUES	22
<hr/>	
III.1. Classification des composés terpéniques	22
III.2. Importance des composés terpéniques	26
CHAPITRE - IV - LES LIPIDES	28
<hr/>	

IV.1. Généralités sur les lipides	28
IV.2. Rôle des lipides	29
IV.3. Constituants d'un lipide	29
IV.3.1. Constituants majeurs	31
IV.3.2. Constituants mineurs	32
IV.4. Propriétés physico-chimiques des lipides	34
IV.4.1. Propriétés physiques	34
IV.4.2. Propriétés chimiques	35

CHAPITRE – V –
ACTIVITÉS BIOLOGIQUES 37

V.1. Activité antioxydante	37
V.1.1. Les radicaux libres	37
V.1.2. Espèces hautement réactives	38
V.1.3. Les antioxydants	40
V.1.3.1. Principaux antioxydants	41
V.1.3.2. Mécanismes d'action des antioxydants	46
V.1.3.3. Evaluation de la capacité antioxydante par des tests <i>In-vitro</i>	47
V.2. Activité antimicrobienne	47
V.2.1. Les bactéries	48
V.2.2. Les antibiotiques	48
V.2.3. Les bactéries étudiées	49
V.2.4. Méthodes d'étude de l'activité antibactérienne	53

CHAPITRE –VI –
ÉTUDE PHYTOCHIMIQUE DES ESPÈCES ETUDIÉES 55

VI.1. La famille des <i>Euphorbiacées</i>	55
VI.1.1. Position systématique de la famille des <i>Euphorbiacées</i>	55
VI.1.2. Caractères morphologiques généraux de la famille des <i>Euphorbiacées</i>	56
VI.1.3. Présentation du genre <i>Euphorbia</i>	57
VI.1.4. La toxicité du genre <i>Euphorbia</i> .	58
VI.1.5. Utilisation en médecine traditionnelle	59
VI.2. Espèces Etudiées	61
VI.2.1. <i>Euphorbia biumbelleta</i>	61
VI.2.2. <i>Euphorbia dendroides</i>	64
VI.2.3. <i>Euphorbia terracina</i>	66

- DEUXIÈME PARTIE -
PARTIE EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE -1-
MATÉRIELS ET MÉTHODES 70

I.1. Matériels végétaux	70
I.2. Réactifs chimiques et appareillage	70
I.3. Screening phytochimique	71

I.4. Dosages des composés phénoliques	74
I.4.1. Dosage des polyphénols totaux (PPT)	74
I.4.2. Dosage des flavonoïdes totaux (FVT)	75
I.4.3. Dosage des tannins condensés (TC)	77
I.5. Identification des composés phénoliques par LC-MS	78
I.6. Etude de la composition chimique des huiles fixes (GC-MS)	79
I.6.1. Extraction de l'huile fixe	81
I.6.2. Préparation des FAME (Fatty Acids Methyl Esters) des huiles	83
I.6.3. Paramètres physico-chimiques des huiles extraites	84
1- Indice d'acide	84
2- Indice de saponification	86
3_ Indice d'iode	86
I.7. Etude des activités anti-oxydantes	87
I.7.1. DPPH test	87
I.7.2. ABTS test	89
I.7.3. PPM test	91
I.8. Etude de l'activité antimicrobienne	93
I.8.1. Souches utilisées	93
I.8.2. Méthode utilisée	93
I.8.3. Stérilisation du matériel	93
I.8.4. Préparation de l'inoculum bactérien	93
I.8.5. Ensemencement et dépôt des disques	93
I.8.6. Expression des résultats	95
CHAPITRE -2-	
RÉSULTATS ET DISCUSSION	97
<hr/>	
II.1. Screening Phytochimique	97
II.2. Dosage des composés polyphénoliques totaux (PPT)	98
II.3. Dosage des flavonoïdes totaux (FVT)	100
II.4. Dosage des tanins condensés (TC)	102
II.5. Analyses chromatographiques des extraits par LC-MS	103
II.6. Etude des huiles fixes	106
II.6.1. Rendements des extractions	108
II.6.2. Etude de la composition chimique des huiles fixes par CG-MS	108
II.6.3. Indices caractéristiques des différentes huiles	110
II.7. Etude de l'activité anti-oxydante	111
II.8. Etude de l'activité antimicrobienne	115
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	120
<hr/>	
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	123
<hr/>	
ANNEXES	137
<hr/>	

Dédicaces

Enfin et après des années d'efforts et de travail, je me trouve en train d'écrire cette fameuse page. C'est avec un énorme plaisir que je remercie aujourd'hui toutes les personnes qui m'ont soutenue durant ces années de travail pour faire réussir cette thèse

Avant tout, nous remercions Dieu tout puissant de nous avoir donné la force, le courage, la persistance et nous a permis d'exploiter les moyens disponibles à fin d'accomplir ce modeste travail, Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

À mes chers parents qu'ils trouvent ici toute ma gratitude pour leur soutien tout le long de mes études.

À mes frères : Rabeh, Rachid et Zakaria.

À mes sœurs: Saida, Soraya, Houria, Samia, Hanane et Firouz.

A mes nièces Aya, Amine, Rimas, Yasmine et Abd El mouemine

À toute ma famille.

À mes amis et mes collègues merci pour les agréables moments qu'on a passé ensemble. Je vous aime tous.

A toute la famille ZEGHAD et ZAKKAD.

Remerciements

Avant toutes choses, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience.

Ces travaux de recherche ont été réalisés au Laboratoire de Synthèse et Biocatalyse Organique (LSBO), Université BADJI-Mokhtar Annaba, et au laboratoire de LCME, Université de Lorraine -Metz- France. Sous la direction de Monsieur : DJILANI Salah Eddine, Professeur à l'université d'Annaba. Je tiens à lui exprimer mon profond respect pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant de diriger et d'encadrer mes travaux de recherches avec attention et fermeté. Merci pour votre compréhension.

Je remercie très chaleureusement Monsieur DJILANI Abd Elouaheb Professeur à l'université d'Annaba. Merci pour m'avoir fait bénéficier de vos profondes connaissances scientifiques, de vos qualités humaines et morales. Soyez assurées de ma profonde gratitude.

J'adresse mes sincères remerciement à Monsieur Amadou DICKO, Professeur à l'université de Lorraine - France, de m'avoir accueilli dans son laboratoire, de la confiance qu'il m'a accordé et aussi pour sa sympathie, et sa rigueur scientifique.

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

Je remercie vivement le professeur AOUF Noureddine qui a accepté de consacrer de son temps à l'étude de ce travail et d'être président de mon jury de thèse. Je suis très honorée de sa présence.

J'exprime ma vive gratitude aux

- Professeur NASRI Hichem
- Professeur BERREDJEM Malika
- Docteur FERCHICHI Loubna

Pour l'immense honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger ce travail.

Tous mes remerciements vont aussi au Professeur DJEROUROU Abdelhafid, Directeur du Laboratoire LSBO et au Docteur DADA Nouredine, membre du Labo, je ne saurai jamais vous remercier assez pour votre aide. Croyez à ma sincère gratitude.

Je remercie chaleureusement toutes les doctorants et les stagiaires qui font partie des équipes du Laboratoire de synthèse et biocatalyse organique, plus particulièrement: Lamia, Abla, Asma, Hanane, Yasmine, Zahra, Sofiane, Mohamad, Imad, Nawal et Houria pour l'ambiance agréable qui régnait dans le laboratoire.

Je remercie également le docteur Tarek HAMEL et madame Samah BOUKHDIR, enseignants du département de Biologie, pour leurs aide et accueil chaleureux.

Un Grand MERCI à tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation et au bon déroulement de ce travail de thèse.

المخلص:

إن الهدف الرئيس من هذا البحث هو القيام بدراسة نباتية كيميائية لثلاثة نباتات من عائلة Euphorbiaceae وهي:

Euphorbia biumbelatta و *Euphorbia dendroides*, *Euphorbia terracina*.

وقد تم إجراء الفحص لمختلف المركبات الفينولية وأظهرت النتائج ثراء هذه النباتات بالبوليفينول، الفلافونيد والتانين.

في جزء ثاني من عملنا، عمدنا الى تحديد التركيب الكيميائي لكل من مستخلصات الأجزاء الهوائية للنباتات والزيوت الثابتة المستخرجة من البذور باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة (LC-MS) والكروماتوغرافيا الغازية (GC-MS) على التوالي. أظهرت النتائج وجود كل من حمض الأسكوربيك، الكلوروجينيك والإلجيك في مختلف المستخلصات. كما أن النوع الذي يحوي على أكثر المعايير الكيميائية هو *euphorbia biumbelatta*. من ناحية أخرى، أظهرت نتائج GC-MS ان زيوت الأنواع الثلاثة تتشكل أساسا من حمض hexadecanoic، حمض eicosatrienoic وحمض linoléique. وإن زيت *euphorbia terracina* تحتوي أيضا على مركب نادر وهو 2,6-acide ascorbique (+) I-dihexadecanoate.

الجزء الأخير يتناول تقييم المستخلصات النباتية المختلفة. في البداية، تم قياس النشاط المضاد للأكسدة لمستخلصات الأنواع الثلاثة باستعمال ثلاث طرق مختلفة (اختبار ABTS، اختبار DPPH واختبار PPM). بعد ذلك، كل المستخلصات خضعت إلى دراسة أنشطتها المضادة للبكتيريا والمضادة للفطريات. أظهرت نتائج اختبار مستخلصات الماء-ميثانول: (MeOH/H₂O) 3/7، وجود نشاط لافت للنظر على سلالات مختلفة.

الكلمات الدالة:

العائلة الفربيونية – الأيضية الثانوية – مضاد للأكسدة PPM – DPPH – ABTS
مضاد للجراثيم – الفلافونويدات.

Summary:

The main objective of this work is to establish a phytochemical study of three plants of the family of Euphorbiaceae namely: *Euphorbia biumbelatta*, *Euphorbia dendroides* and *Euphorbia terracina*.

The dosage of the various phenolic compounds was realized and the found values showed the wealth of these plants in polyphenols, flavonoids and tannins.

In a second part of our work, we proceeded to the identification of the chemical composition of the extracts of the aerial part and of the fixed oils from seeds by using liquid chromatography (LC MS) and gas chromatography (GC-MS) respectively. The results showed the presence of ascorbic acids, chlorogenic acids and ellagic acids in the different extracts. The species that contains the more standards were *euphorbia biumbelatta*. On the other hand, the GC-MS analyses revealed that the oil of three species contain mainly the hexadecanoic acids, eicosatrienoic acids and linoleic acids. The oil of *euphorbia terracina* also contained a rare compound which is the l-(+)-Ascorbic acid 2,6-dihexadecanoate.

The last part concerns the valuation of the various extracts of plants. At first, the antioxidant activity of the extracts of three species is measured by three different methods (test of the ABTS, test of the DPPH and the test of the PPM). Then, all the extracts underwent a study of their antibacterial and antifungal activities. The hydro-méthanoliques extracts (7/3: MeOH/H₂O) showed a very remarkable antibacterial and antifungal activities on different strains.

Keywords:

Euphorbiaceae - Secondary metabolites - Antioxydant – ABTS - DPPH - PPM - Antibacterial - Flavonoids.

Résumé :

L'objectif principal de ce travail de recherche est d'établir une étude phytochimique de trois plantes de la famille des Euphorbiacées à savoir : *Euphorbia biumbelatta*, *Euphorbia dendroides* et *Euphorbia terracina*.

Le dosage des différents composés phénoliques a été réalisé et les valeurs trouvées ont montré la richesse de ces plantes en polyphénols, flavonoïdes et tanins.

Dans une deuxième partie, on a procédé à l'identification des compositions chimiques des extraits de la partie aérienne et des huiles fixes issues des graines en utilisant respectivement la chromatographie liquide (LC MS) et la chromatographie gazeuse (CG-MS). Les résultats montrent la présence des acides ascorbique, chlorogénique et ellagique dans les différents extraits. L'espèce qui renferme le plus de standards était l'*euphorbia biumbelatta*. D'autre part, les résultats de la CG-MS, montrent que les huiles des trois espèces sont formées essentiellement d'acide hexadécanoïque, d'acide eicosatriénoïque et d'acide linoléique. L'huile fixe de l'*euphorbia terracina* contient également un composé rare qui est le l-(+) acide ascorbique 2,6-dihexadécanoate,

La dernière partie porte sur la valorisation des différents extraits des plantes. Dans un premier temps, l'activité anti-oxydante des extraits des trois espèces est mesurée par trois méthodes différentes (ABTS, DPPH et PPM). Ensuite, tous les extraits ont subi une étude de leurs activités antibactérienne et antifongique. Les extraits hydro-méthanoliques (7/3 : MeOH/H₂O) ont manifesté des activités antibactériennes et antifongiques très remarquables sur différentes souches.

Mots clés :

Euphorbiacées – Métabolites secondaires –antioxydant – ABTS – DPPH – PPM – Antibactérien – Flavonoïdes –

ABRÉVIATIONS

λ : longueur d'onde exprimée en nm.

Abs : Absorbance.

ABTS : acide 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique.

AG : acide gras.

ATCC : American Type Culture Collection.

BMH : bouillon Mueller Hinton

CCM : Chromatographie sur couche mince.

CG-MS : Chromatographie en phase gazeuse/Spectre de masse.

CMB : Concentration Minimale.

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.

Da : dalton

DMSO : diméthylsulfoxyde.

DO : densité optique.

DPPH : diphényl picrylhydrazyl.

ERN : espèces réactives azotées.

ERO : espèces réactives oxygénées.

FAME: fatty acid methyl ester.

FVT : flavonoïdes totaux.

mg : milligramme.

MH : Mueller Hinton.

Min : minute.

ml : millilitre.

LC-MS : HPLC couplée a la spectrométrie de masse.

PI : pourcentage d'inhibition.

PPM : PhosphoMolybdate

PPT : Polyphénols totaux.

RP-18 : silice greffée en C-18.

TC : tannins condensés.

UV : ultra-violet.

V/V : Volume / Volume.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Molécules impliquées dans la biosynthèse des flavonoïdes.	14
Tableau 2: Activités biologiques du genre Euphorbia	60
Tableau 3: Screening phytochimique de la partie aérienne des espèces étudiées	97
Tableau 4: Teneurs en polyphénols totaux des différents extraits (g EAG /100g Ms)	99
Tableau 5: Teneurs en flavonoïdes totaux des différents extraits (g QE/100g Ms)	101
Tableau 6: Teneurs en tanins totaux des différents plantes.	102
Tableau 7: Temps de rétention des standards	104
Tableau 8: Tableau récapitulatif des résultats de l'analyse chromatographique.	105
Tableau 9: Rendement de l'huile fixe issue des trois plantes.	106
Tableau 10: Compositions chimiques d'huile des graines de l'Euphorbia biumbelatta.	107
Tableau 11: Compositions chimiques d'huile des graines de l'Euphorbia dendroides.	108
Tableau 12: Compositions chimiques d'huile des graines de l'Euphorbia terracina.	109
Tableau 13: Résultats de l'activité antioxydante (EVC g/100g Ms).	113
Tableau 14: Valeur de PI et IC50 de l'activité antioxydante pour le test DPPH.	114
Tableau 15: Sensibilité et degré d'activité selon le diamètre d'inhibition.	115
Tableau 16: Activité antibactérienne des extraits méthanolique par la méthode de diffusion.	116

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Effets biologiques des polyphénols.	8
Figure 2: dérivés d'acide phénolique..	10
Figure 3: Structure chimique des acides gallique (A) et ellagique (B).	12
Figure 4: Structure de base des tanins condensés.	13
Figure 5: Squelette de base des flavonoïdes et numérotation adoptée	14
Figure 6: Schéma simplifié de la biosynthèse des flavonoïdes.	15
Figure 7: Structure de base des flavonoïdes avec numérotation.	16
Figure 8: structure de base des flavones.	17
Figure 9: Structure de base des flavonols.	18
Figure 10: Structure de base des flavanones.	18
Figure 11 : Structure de base des isoflavones.	20
Figure 12 : Structure de base des anthocyanes avec un exemple.	20
Figure 13: Eléments essentiels pour avoir une bonne activité antioxydante des flavonoïdes.	21
Figure 14: Menthol.	23
Figure 15: Exemples des sesquiterpènes.	24
Figure 16: Vitamine A.	25
Figure 17: Vitamine K1.	25
Figure 18: Exemples des tetraterpènes.	26
Figure 19: Formule générale d'un triglycéride d'acides gras.	28
Figure 20: Constituants des huiles végétales.	30
Figure 21: Glycérol et Triglycéride.	32
Figure 22: Cholestérol.	33
Figure 23: Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydants.	38
Figure 24: Formation des différentes espèces réactives : ERO et ERN.	40
Figure 25: Structure de la vitamine C.	43

Figure 26: Structures des tocophérols.	44
Figure 27: structure de β -carotène.	45
Figure 28: Schéma d'un cyathium.	57
Figure 29: Latex.	58
Figure 30: Classification de l'espèce <i>Euphorbia biumbelatta</i> .	61
Figure 31: <i>Euphorbia biumbelatta</i> (photo prise par F.Zeghad, 2014)	62
Figure 32: Classification de l'espèce <i>Euphorbia dendroides</i> .	64
Figure 33: <i>Euphorbia dendroides</i> .	65
Figure 34: Classification de l'espèce <i>Euphorbia terracina</i> .	67
Figure 35: <i>Euphorbia terracina</i> .	68
Figure 36: composés terpéniques isolés d' <i>Euphorbia terracina</i> .	69
Figure 37: Extraction des huiles fixes.	82
Figure 38: Huile issue des graines.	83
Figure 39: Structure chimique du radical libre DPPH• (2,2 DiPhenyle-1-Picryl-Hydrazyle).	88
Figure 40: Mécanisme d'action de DPPH	88
Figure 41: Acide 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS).	90
Figure 42: dépôt des disques dans la boîte de pétri.	94
Figure 43: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.	98
Figure 44: Teneur en composés phénoliques totaux.	99
Figure 45: Courbe d'étalonnage de la quercitine.	100
Figure 46: Teneur en flavonoïdes totaux.	101
Figure 47: Courbe d'étalonnage pour le dosage des tanins totaux.	102
Figure 48: Profil chromatographique du mélange des étalons à 280 nm.	103
Figure 49: Profil chromatographique du mélange des étalons à 360 nm.	104
Figure 50: Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile des graines d' <i>Euphorbia biumbelatta</i> .	107
Figure 51: Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile des graines d' <i>Euphorbia dendroides</i> .	108
Figure 52: Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile des graines d' <i>Euphorbia terracina</i> .	109
Figure 53: Caractéristiques physico-chimiques des huiles fixes des graines.	110
Figure 54: Courbe d'étalonnage de la vitamine C en utilisant le test DPPH.	112
Figure 55: Courbe d'étalonnage de la vitamine C en utilisant le test ABTS.	112
Figure 56: Courbe d'étalonnage de la vitamine C en utilisant le test PPM.	113
Figure 57: Capacité antioxydante exprimée en vitamine C selon les tests :ABTS, DPPH et PPM.	114
Figure 58: Diamètre de la zone d'inhibition des extraits méthanoliques des trois plantes pour la concentration de 25 mg/ml.	117
Figure 59: Diamètre de la zone d'inhibition des extraits méthanoliques des trois plantes pour la concentration de 200 mg/ml.	118
Figure 60: Effet inhibiteur de l'extrait de l'E. biumbelatta sur Staph. ep et Entérobactère.	119
Figure 61 : Effet inhibiteur de l'extrait de l'E. dendroides sur Staph. Ep et Klebsiella p.	119

PREMIERE PARTIE

SYNTHÈSE

BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION

ET

OBJECTIFS

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La nature dans toutes ces mitoyennetés, est prédominée par la couleur verte des plantes. Ces plantes ont une fascination pour l'homme et les animaux [1].

De tous les temps, les plantes ont occupé une place prééminente dans la vie de l'Homme. Toutes les civilisations connues ont utilisé les plantes soit sauvages soit cultivées pour se nourrir, se défendre, se vêtir ou se soigner. L'utilisation thérapeutique des extraordinaires vertus des plantes, pour le traitement des maladies de l'Homme est très vieille et a progressé avec l'histoire de l'humanité.

Les connaissances empiriques accumulées ont permis aux différentes civilisations de prendre les plantes comme source principale de médicaments. Jusqu'au début du 20^{ème} siècle, presque tous les médicaments étaient à base de plantes et on estime que deux tiers des médicaments actuels ont une origine naturelle.

Aujourd'hui, Les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules indispensables à la mise au point de futurs médicaments [2]. Sachant que plus de 25% des médicaments ordonnés dans les pays industrialisés tirent directement ou indirectement leurs origines des plantes [3,4]. Dans le monde, près de 80% de la population a recours aux plantes médicinales par insuffisance d'accès aux médicaments prescrits mais aussi parce que les plantes ont pu prouver une réelle efficacité, Une majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne strictement avec des remèdes traditionnels à base de plantes [5].

Les plantes sont capables de produire une grande diversité de produits ne participant pas à leur métabolisme de base, mais représentant plutôt des produits du métabolisme

secondaire parmi lesquels on distingue les terpénoïdes, les alcaloïdes et les composés phénoliques. Avec leur diversité structurale remarquable, ces derniers, également appelés polyphénols, représentent l'un des groupes les plus importants du fait qu'ils aient une faible toxicité et de nombreux avantages biologiques, notamment thérapeutiques, pharmaceutiques, cosmétologiques et alimentaires. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la germination des graines ou la maturation des fruits. Les plus représentés sont les anthocyanes, les flavonoïdes et les tannins [6].

Du fait de la diversité de son climat "Méditerranéen, continental et aride ", l'Algérie possède une flore végétale riche et diversifiée, avec plus de 3000 plantes dont 15% sont endémiques et appartenant à plusieurs familles botaniques [7]. Pour cela, l'industrie pharmaceutique, les médecins, les biologistes et les chimistes cherchent à mieux connaître le patrimoine des espèces spontanées utilisées en médecine traditionnelle. Leurs modes d'utilisation, leurs indications dans diverses pathologies ainsi les principes actifs sont étudiés depuis une vingtaine d'années [8-10].

C'est dans le cadre de la valorisation des substances naturelles des plantes de la flore Algérienne jouissant d'activités biologiques, que s'inscrit notre travail. Et dans le but de poursuivre ce programme de recherche, nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique de trois genres de l'*Euphorbia* à savoir :

- *Euphorbia biumbelleta*
- *Euphorbia dendroides* L.
- *Euphorbia terracina*

La première partie de ce travail de recherche porte sur une synthèse d'une recherche bibliographique. D'abord, une étude sur les métabolites secondaires, en l'occurrence les composés phénoliques et les composés terpéniques puis sur quelques activités biologiques (activité antioxydante et antibactérienne).

La seconde partie, purement expérimentale, s'articule autour de trois contributions majeures :

La première est consacrée d'une part au criblage phytochimique et d'autre part aux dosages des différents composés phénoliques (polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et tanins condensés) présents au niveau des différentes parties des trois plantes étudiées.

La deuxième est destinée à l'extraction des métabolites secondaires, en suite à l'isolement et l'identification des composés phénoliques par chromatographie en phase liquide couplée à la spectroscopie de masse (LC-MS) et à l'étude de la composition chimique des huiles fixes par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (CG-MS).

La dernière porte sur la valorisation des différents extraits des plantes. Dans un premier temps, l'activité anti-oxydante des extraits des trois espèces est mesurée par trois méthodes différentes (test de l'ABTS, test du DPPH et test du PPM). Ensuite, tous les extraits testés ont subi une étude de leurs activités antibactérienne et antifongique.

On termine notre travail par une conclusion générale et perspective.

Notons enfin que les extractions des flavonoïdes et des polyphénols ainsi que les évaluations des activités antibactérienne et antioxydante ont été réalisées au Laboratoire de Synthèse et Biocatalyse Organique (LSBO), Université BADJI Mokhtar –Annaba-, alors que les analyses chromatographiques sont réalisées au laboratoire du professeur A. Dicko (LCME), Metz – France.

CHPITRE –I–

LES MÉTABOLITES SECONDAIRES

I. LES MÉTABOLITES SECONDAIRES

I.1. Introduction

La plante est le siège d'une intense activité métabolique aboutissant à la synthèse de principes actifs les plus divers. Ce processus métabolique est lié aux conditions mêmes de vie de la plante. On conçoit donc que la plante puisse développer un métabolisme particulier lui permettant de synthétiser des substances très diverses : les métabolites primaires et les métabolites secondaires [11].

Les métabolites primaires sont des molécules organiques qui se trouvent dans toutes les cellules de l'organisme d'une plante pour y assurer sa survie. Ils sont divisés en quatre grandes familles : les glucides, les lipides, les acides aminés et les acides nucléiques.

Les métabolites secondaires sont des produits, à structure chimique souvent complexe, très dispersés et très différents selon les espèces [12]. Ils représentent une grande source potentielle d'agents thérapeutiques [13].

Ils pourraient jouer un rôle dans la défense contre les herbivores, et dans les relations entre les plantes et leur environnement : plusieurs composés phénoliques participent à la filtration des UV, les pigments floraux sont essentiels aux processus de pollinisation [14].

I.2. Définition

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes, ces produits sont en très grand nombre, plus de 200.000 structures définies et sont d'une variété structurale extraordinaire.

Ces molécules marquent de manière originale, une espèce, un genre ou une famille de plante ils sont classés selon leur appartenance chimique en l'occurrence, les terpènes, les alcaloïdes, les composés acétyléniques, les cires, et les composés phénoliques [12,15].

I.3. Classification

A travers l'étude bibliographique, il est clair et évident que les métabolites secondaires constituent un groupe de produits naturels qu'il convient d'explorer pour des propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires et anticancéreuses [16]. Ils sont divisés principalement en trois grandes familles : Les polyphénols, les terpènes, les alcaloïdes [17,18].

I.3.1. Les polyphénols

Les polyphénols sont des molécules synthétisées par les végétaux et appartenant à leur métabolisme secondaire. Ils participent à la défense des plantes contre les agressions environnementales. Ils sont caractérisés par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes, généralement de hauts poids moléculaire.

I.3.2. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont un groupe de composés qui ont la particularité de renfermer au moins un atome d'azote. De ce fait, ce sont des bases qui existent le plus souvent dans la plante sous forme de sels. A l'exception de ceux qu'on appelle parfois des pseudo-alcaloïdes (ex. : solanine, conine).

I.3.3. Les terpènes

Les Terpènes sont des hydrocarbures qui contiennent habituellement un ou plusieurs liens doubles de C=C, ils sont complètement distribués dans le règne végétal, mais on peut les rencontrer aussi chez les animaux [19,20]. Les terpènes sont formés par la condensation d'unités de base à 5 carbones de type isoprène.

CHPITRE –II–

LES COMPOSÉS
PHÉNOLIQUES

II. LES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES

Les composés phénoliques ou les polyphénols ont reçu ces dernières années un intérêt particulier dans la recherche médicale et nutritionnelle ainsi que dans l'industrie alimentaire.

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux, caractérisés par la présence d'au moins d'un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside...etc. [21,22].

En effet les composés phénoliques, constituent le groupe le plus nombreux et le plus largement distribué dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connus [22]. Ils sont localisés dans différentes parties des plantes selon l'espèce végétale et le groupe polyphénolique considérés.

Comme définition, nous pouvons dire que les polyphénols sont des composés phénoliques hydrosolubles, de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Dalton, et ayant, outre les propriétés habituelles des phénols, la capacité de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et autres protéines [23-25].

Ils peuvent aller de molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés comme les tannins [24,25].

II.1. Biosynthèse

La biosynthèse des polyphénols se fait par trois voies principales qui sont :

A. La voie de Shikimate

C'est souvent la voie de biosynthèse des composés aromatiques, elle joue un rôle critique pour contrôler le métabolisme de la voie de phénylpropanoïde [26].

B. La voie de phénylpropanoïde

La voie de phénylpropanoïde commence par la phénylalanine qui fournit en plus des principaux acides phénoliques simples, coumarines, isoflavonoïdes, flavonoïdes, acide salicylique, des précurseurs de lignine, qui est quantitativement le second bio-polymère le plus important après la cellulose.

II.2. Activité biologiques des polyphénols

Les polyphénols sont connus pour leurs activités biologiques nombreuses qui sont en relation directe avec la santé de l'être humain.

II.2.1. Chez les humains

Selon les résultats de certaines études conduites chez l'Homme ces dernières années, les composés phénoliques seraient impliqués dans la prévention des maladies cardiovasculaires et peut-être également d'autres pathologies telles que les maladies neurodégénératives, le diabète, l'ostéoporose et les cancers.

La principale caractéristique des polyphénols est qu'ils sont des agents antioxydants très puissants [27-29]. En effet, ils sont capables de piéger les radicaux libres et d'activer les autres antioxydants présents dans le corps.

Ces composés sont ainsi devenus les molécules préférées des nutritionnistes, des épidémiologistes, des industriels de l'agroalimentaire et des laboratoires pharmaceutiques et cosmétiques.

Les composés phénoliques présentent d'autres activités anti-inflammatoire [30] et antivirale et en particulier anti-HIV [31].

Ils sont largement utilisés en thérapeutique comme vasculoprotecteurs [32], anti-inflammatoires [33,34], antiradicalaires et antioxydants [35], analgésiques [36,37].

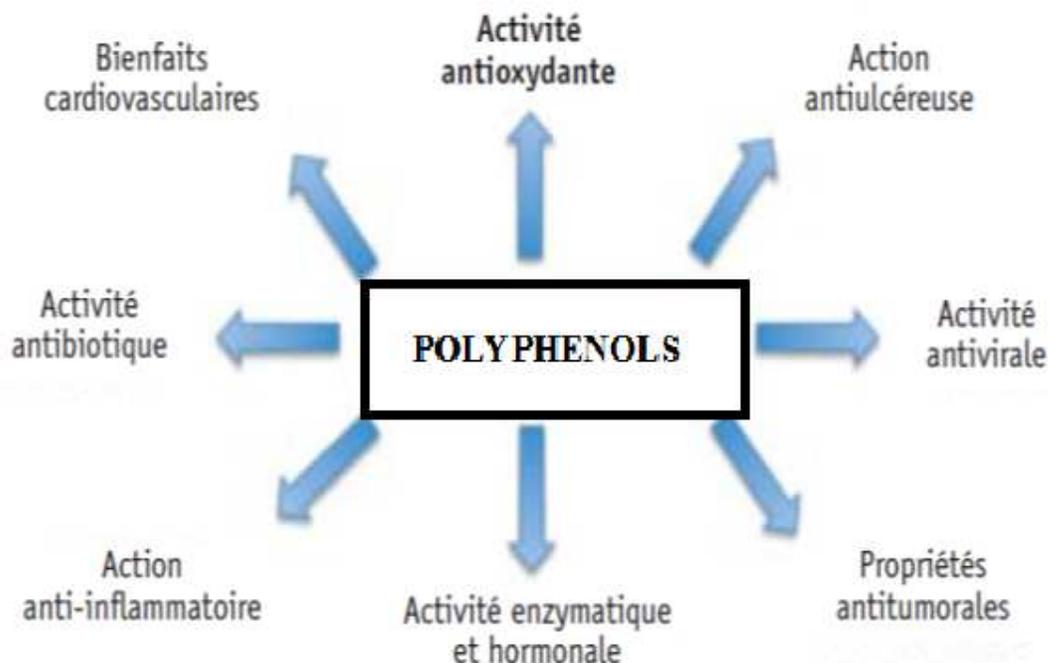


Figure 1: Effets biologiques des polyphénols [38].

II.2.2. Chez les végétaux

Les polyphénols sont partiellement responsables des qualités sensorielles et alimentaires des aliments végétaux (couleur, astringence, qualités nutritionnelles...).

La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques [39]. Ces composés représentent un système de défense pour les plantes contre les micro-organismes pathogènes [40].

Les composés phénoliques peuvent intervenir dans certains aspects de la physiologie de la plante (lignification, régulation de la croissance, interactions moléculaires avec certains microorganismes symbiotiques ou parasites...), dans les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (relations avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux UV).

II.3. Classification des polyphénols

Les principales classes de composants phénoliques sont : les acides phénoliques (acide caféique, acide hydroxycinnamique, acide chlorogénique), les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols, les tanins, et les coumarines [41,42]. Les polyphénols sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racine, tiges, feuilles, fleurs, fruits [7].

II.3.1. Acides phénoliques

Les acides phénols, ou acides phénoliques, sont rares dans la nature. Ce sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ils présentent des propriétés biologiques intéressantes : antiinflammatoires, antiseptiques urinaire, antiradicalaires, cholagogues, hépatoprotecteurs, cholérétiques, immunostimulants [43]. Ces composés sont représentés par deux sous-classes : les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque et de l'acide hydroxycinnamique [44].

A. Dérivés de l'acide hydroxybenzoïque (C6-C1)

Les acides benzoïques sont formés d'un squelette à sept atomes de carbones. Ils sont très communs aussi bien sous forme libre que sous forme combinée à l'état d'esters ou hétérosides [44,45]. Cette catégorie est abondante dans les végétaux et les aliments, notamment les épices, les fraises, certains fruits rouges et l'oignon dans lesquels les concentrations peuvent atteindre plusieurs dizaines de milligrammes par kilogramme de fruits frais [46]. Ils sont principalement représentés par les acides p-hydroxybenzoïques, protocatéchiques, vanilliques, galliques, syringiques, salicyliques, o-hydroxybenzoïques et gentisiques.

B. Dérivés de l'acide hydroxycinnamique (C6-C3)

Ces acides possèdent une structure du type C6-C3, ils ont une distribution très large. Rarement libres, ils sont souvent estérifiés [45] et peuvent également être amidifiés ou combinés avec des sucres (O-acylglucosides, Oarylglucosides) ou des polyols tels que l'acide quinique [44]. Les composés les plus fréquents sont l'acide p-coumarinique, l'acide caféique (Il représente 75 à 100% de la teneur totale en acides hydroxycinnamiques de la majorité des fruits) (figure 2) [15], l'acide tartrique et l'acide cinnamique [47].

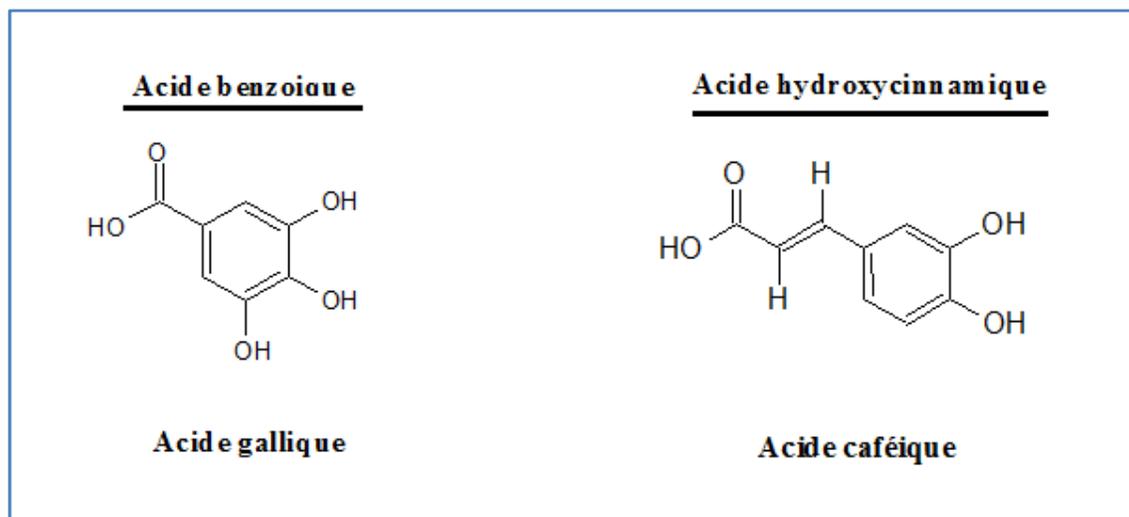


Figure 2: dérivés d'acide phénolique.

II.3.2. Coumarines

Les coumarines sont parmi les composés phénoliques les plus connus. Elles sont substituées en C-7 par un hydroxyle. La 7-hydroxycoumarine, connue sous le nom d'ombelliférone, est le précurseur des coumarines 6,7-di- et 6,7,8-trihydroxylées.

A présent plus de 1000 composés coumariniques sont isolés dont plus de 800 sont issus des plantes et des micro-organismes.

Les coumarines de différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales, ils ont fréquemment un rôle écologique ou biologique, ils sont capables de prévenir la

peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes [48,49].

Les coumarines sont connues par leurs activités cytotoxiques, antivirales, tranquillisantes, vasodilatatrices, anticoagulantes (au niveau du cœur), hypotensives ; elles sont également bénéfiques en cas d'affections cutanées [50].

II.3.3. Tanins

On appelle communément « Tanins » des substances d'origine végétale, non azotées, de structure polyphénolique, soluble dans l'eau, l'alcool, l'acétone, peu soluble dans l'éther.

Les tanins (ou tannins) représentent une classe très importante de polyphénols utilisés pour tanner les peaux. Ils ont la propriété de se combiner aux protéines, ces combinaisons varient d'une protéine à une autre selon les degrés d'affinités [51]. Les tanins sont localisés dans les vacuoles [52], Leur poids moléculaire est compris entre 500 et 3000 Da [53].

Les tanins sont des macromolécules de structure variée, on les retrouve dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbre et les fruits (raisin, datte, café, cacao...). Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques et leur degré d'oxydation [54].

Comme les autres types de polyphénols, les tannins sont aussi répandus pour leurs nombreuses activités thérapeutiques notamment ; anti-infectieuses [55,56], cardiovasculaires [57,58], hormonodépendantes et anticancéreuses [59,60].

On distingue habituellement chez les végétaux supérieurs, deux groupes de tanins différents par leur structure aussi bien que par leur origine biogénétiques : Les tanins hydrolysables et les tanins condensés [27].

A. Les tannins hydrolysables

Ces tannins sont des esters du D-glucose et de l'acide gallique ou de ses dérivés, en particulier l'acide ellagique (Fig. 3). Ces composés donnent après hydrolyse à chaud à l'aide de solutions acides étendues une fraction glucidique (glucose) et une fraction polyphénolique [61]. Ces substances sont facilement hydrolysables par voie chimique ou enzymatique (tannase) [47].

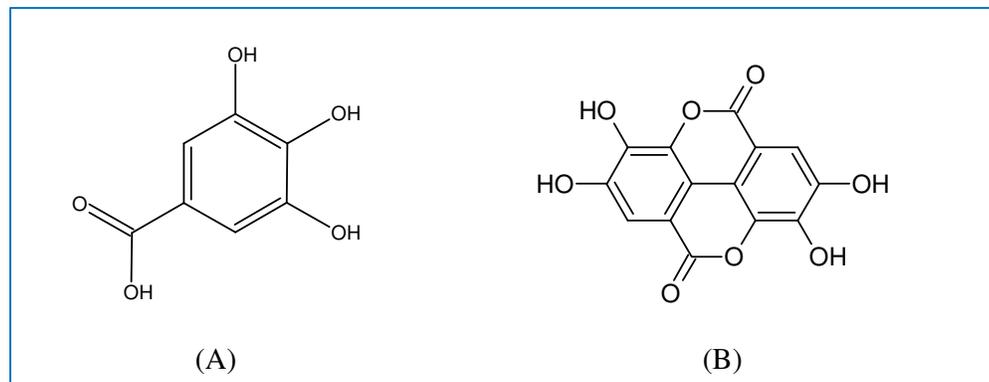


Figure 3: Structure chimique des acides gallique (A) et acide ellagique (B).

B. Les tannins condensés

Ces composés sont appelés aussi proanthocyanidines. Ils possèdent comme structure de base le flavan-3-ol ou le flavan-3,4-diol [43]. Ces tannins ne renferment pas de sucres dans leurs molécules. Ils ne sont pas hydrolysés par les acides comme c'est le cas des tannins hydrolysables. Ils se transforment en présence d'acide fort ou d'agents d'oxydation en substances rouges qui sont les phlobaphènes [62].

En raison de leur complexation avec les protéines salivaires, les tanins condensés sont responsables de l'astringence caractéristique des fruits avant maturité (raisin, pêche, pomme, poire, etc...) et de certaines boissons (cidre, thé, etc...) et de l'amertume du chocolat.

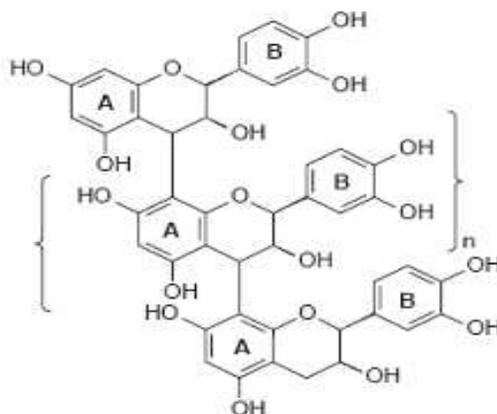


Figure 4: Structure de base des tanins condensés.

II.3.4. Flavonoïdes

II.3.4.1. Structure et origine

Le nom flavonoïde proviendrait du terme flavedo, désignant la couche externe des écorces d'orange [63], cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du flavus ; (flavus = jaune) [64].

Les flavonoïdes sont des molécules très répandues dans le règne végétal. Ils constituent la plus vaste classe de composés phénoliques principaux métabolites secondaires des plantes. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles.

On les trouve dissous dans la vacuole des cellules à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastes particuliers, les chromoplastes [65].

Ces composés ont une structure de base formé de 2 noyaux benzéniques A et B reliés par un noyau C qui est un hétérocycle pyranique [66].

Généralement, la structure des flavonoïdes est représentée selon le système C6-C3-C6 [67], en formant une structure de type diphényle propane dont des groupements hydroxyles,

oxygènes, méthyles, ou des sucres peuvent être attachés sur les noyaux de cette molécule [68,69].

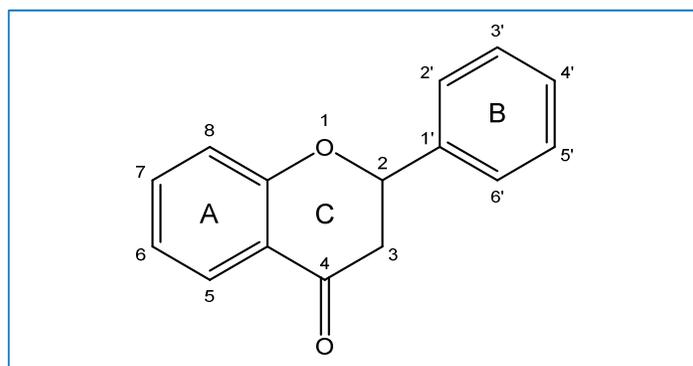


Figure 5: Squelette de base des flavonoïdes et numérotation adoptée.

II.3.4.2. Biosynthèse

Depuis plusieurs décennies, l'analyse et la compréhension du métabolisme phénolique, plus particulièrement celui des flavonoïdes, constitue un réel défi pour un grand nombre d'équipes scientifiques.

Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune dérivant de la voie de l'acide shikimique. La biosynthèse de ces molécules se fait à partir d'un précurseur commun qui est la 4,2',4',6'-tétrahydrochalcone [43].

Tableau 1: Molécules impliquées dans la biosynthèse des flavonoïdes.

Enzymes	Intermédiaires synthétisés
Chalcone synthase (CHS)	Chalcone
Chalcone Isomérase (CHI)	Flavanone
Flavone Synthase (FS)	Flavone
Flavanone-3-Hydroxylase (F3H)	Dihydroflavonol
Flavonol Synthase (FLS)	Flavonol
Chaîne enzymatique (FNR, ANS, GT)	Dérivés anthocyaniques

La figure 6 donne le schéma des réactions qui permettant d'interpréter la formation des principaux flavonoïdes à partir des chalcones.

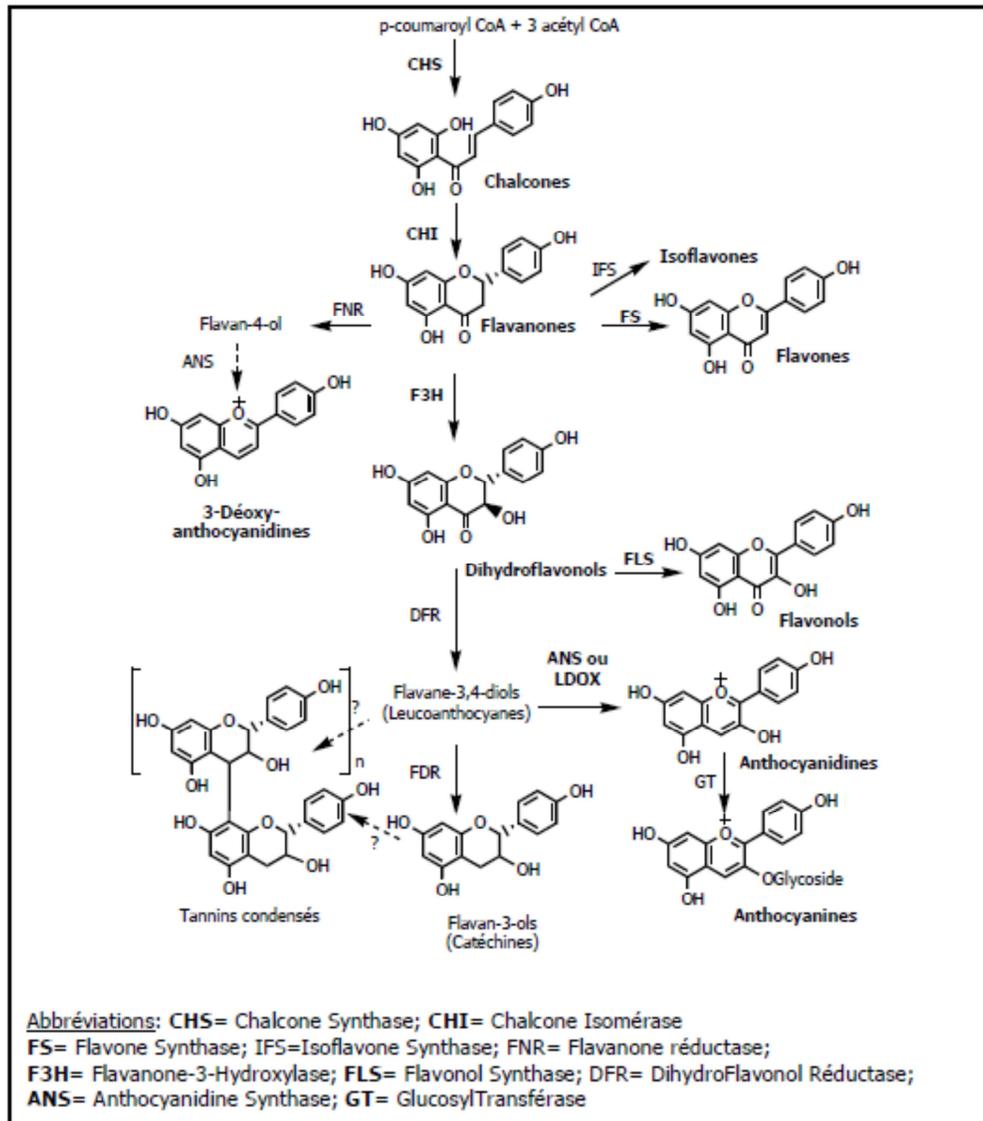


Figure 6: Schéma simplifié de la biosynthèse des flavonoïdes [70].

Le passage de chalcone en flavonoïde se fait par plusieurs étapes comme la méthylation, la glycosylation et l'acylation (Figure 6). L'enzyme clé de la biosynthèse c'est

la chalcone synthase (CHS) qui catalyse la condensation de trois unités acétate à partir de malonyl-COA avec la 4-coumaroyl-COA. L'isomérisation des chalcones par la chalcone isomérase (CHI) conduit à la formation des flavanones. Ces derniers vont subir soit une oxydation par la flavone synthase (FS) et donnent les flavones. Tandis que l'hydroxylation des flavanones par la flavanone-3-hydroxylase (F3H) donne des dihydroflavonols qui peuvent s'oxyder en flavonols par la flavonol synthase (FLS) [71,72].

Plusieurs enzymes (synthase, réductase, hydroxylase) contribuent à l'apparition des différentes classes de flavonoïdes. Des étapes ultérieures surtout de glycosylation et acylation amènent les flavonoïdes à la forme définitive dans laquelle elles se trouvent *in vivo* [72].

II.3.4.3. Classification

Les flavonoïdes constituent le principal groupe de polyphénols, avec près de 6500 composés différents identifiés dans le règne végétal (soit environ 50% des polyphénols), et leur nombre ne cesse d'accroître.

Ces molécules se divisent en plusieurs sous-classes qui se distinguent par une diversité fonctionnelle au niveau des positions 2, 3 et 4 du cycle C (Figure 7).

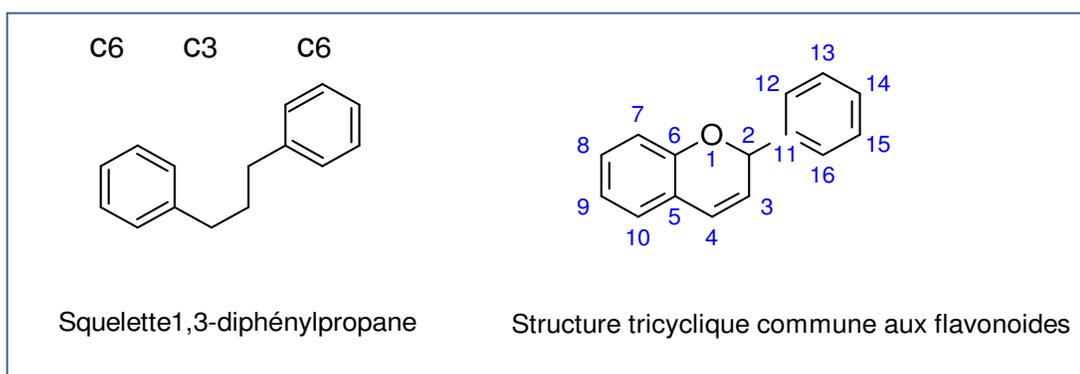


Figure 7: Structure de base des flavonoïdes avec numérotation.

Pour chaque classe de flavonoïde, les molécules diffèrent entre elles par le nombre et la position des groupements hydroxyle, la présence de substituant sur la génine (flavonoïde

non substitué) et le degré de polymérisation.

Dans une même sous-classe, les possibilités de substitution des cycles A et B sont multiples : les carbones du squelette flavonoïde peuvent porter un substituant de type hydroxyle, méthoxyle, méthyle, isoprényle ou benzyle.

Les flavonoïdes sont divisés en plusieurs classes dont les plus importantes sont les flavanones, les flavonols, les flavones, les flavanols, les isoflavones et les anthocyanes [19,74,75]. Ces composés sont fréquemment attachés à des sucres (glycosides), ce qui leur confère un caractère plus hydrosoluble. Occasionnellement, on peut les retrouver sous forme d'aglycones.

Les propriétés chimiques de ces composés varient suivant leur classe, mais également en fonction de leur degré d'hydroxylation, de leur degré de méthylation, de leur degré de glycosylation et du degré de polymérisation autour de la structure commune C₆-C₃-C₆ [76-78]

A. Les flavones

Les flavones sont caractérisés par une structure C₆-C₃-C₆ avec une double liaison entre les carbones 2 et 3 de l'hétérocycle du squelette flavane et une fonction cétone en position 4 (4-oxo). Le cycle aromatique B est attaché à la position 2 (figure 8).

Ces composés sont présents principalement dans les céréales et certains légumes.

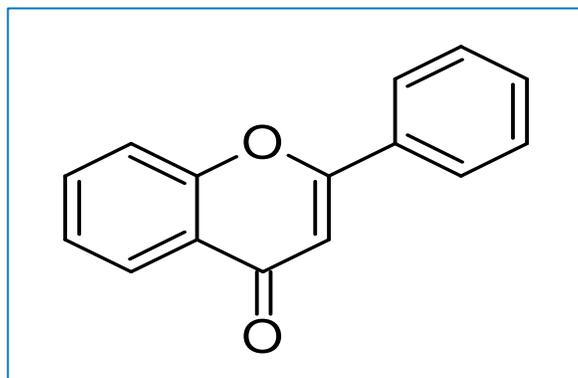


Figure 8: structure de base des flavones.

Les flavonols

Les flavonols sont des flavones qui se caractérisent par la présence d'un groupement hydroxyle (OH) en position C-3 [79], de l'hétérocycle central C et d'une double-liaison en C₂- C₃ (Figure 9).

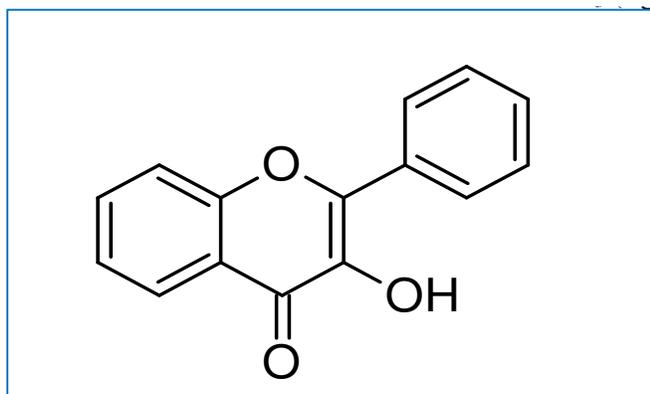


Figure 9: Structure de base des flavonols.

B. Flavanones et dihydroflavonols

Les flavanones présentent des structures uniques qui diffèrent des autres flavonoides, par l'absence de la double liaison entre le C₂ et le C₃ et par la présence des centres d'asymétrie en position 2 [80,81] (Figure 10).

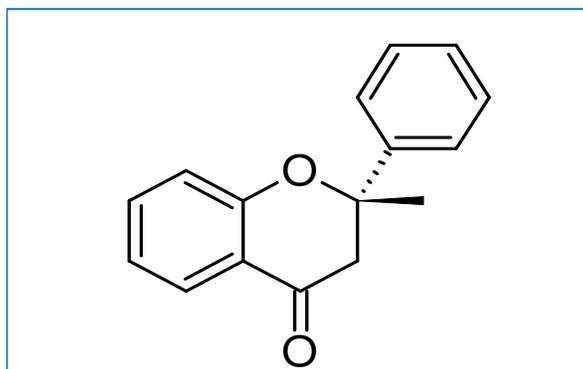


Figure 10: Structure de base des flavanones.

C. Isoflavones

Les isoflavonoïdes constituent une spécifique classe des flavonoïdes, qui diffèrent des autres par la position C₃ sur l'hétérocycle pyranique central C du noyau aromatique B. (Figure 11). C'est une classe de composés très variés ; on peut distinguer : les isoflavones, les isoflavanones, les isoflavanes, etc.

Jusqu'à présent, plus de 1600 isoflavonoïdes aglycones et glycosides ont été identifiés, leurs dérivés possèdent beaucoup de propriétés pharmacologiques [82]. La principale source alimentaire est le soja.

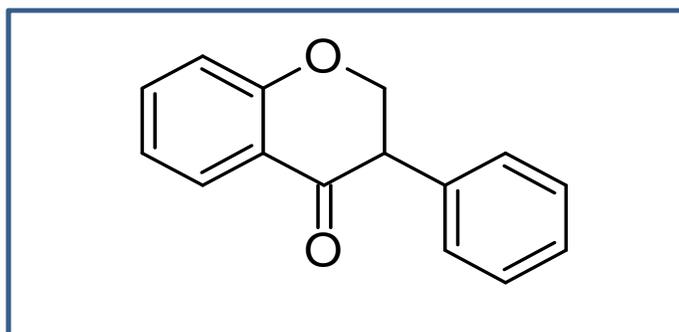


Figure 11 : Structure de base des isoflavones.

D. Les anthocyanes

Les anthocyanes sont des flavonoïdes qui portent une charge sur l'oxygène de l'hétérocycle central C (Figure 12). Ils représentent les pigments les plus importants des plantes. Leur nombre trouvé jusqu'à présent, dépasse les 400 [83-84].

Ces composés interviennent directement dans les interactions plantes animaux et surtout dans l'attraction des pollinisateurs par la couleur des fleurs [85].

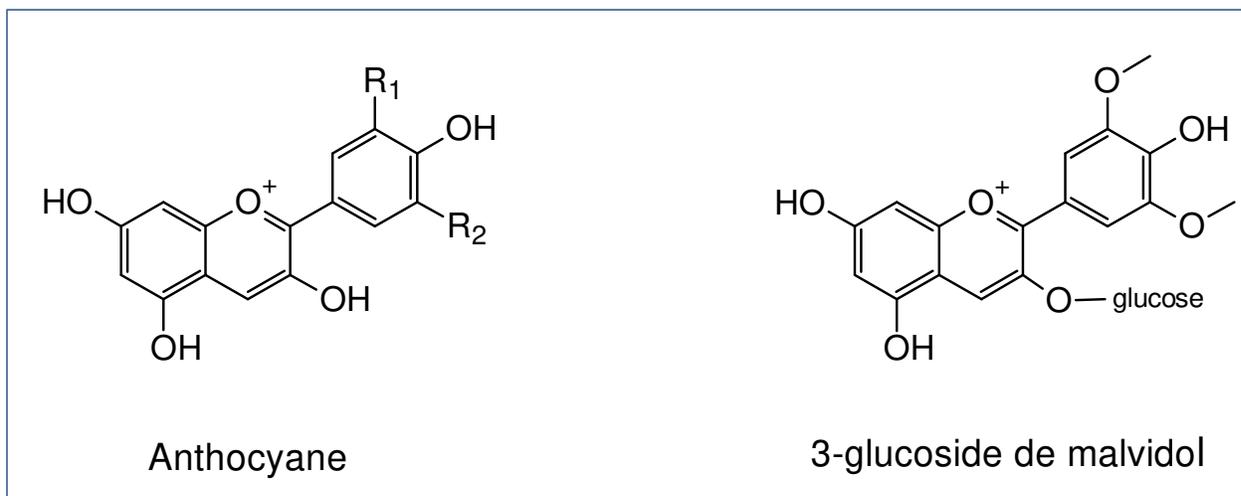


Figure 12 : Structure de base des anthocyanes avec un exemple.

II.3.5. Relation structure-activité antioxydante des flavonoïdes :

Les éléments structuraux nécessaires à l'obtention d'une activité antioxydante optimale ont été établis par plusieurs auteurs (figure 13).

En résumé, les flavonoïdes les plus actifs sont ceux qui combinent les trois critères suivants : [86-88].

1. La présence d'une fonction catéchol (structure ortho-dihydroxy) sur le cycle B, La configuration des hydroxyles du noyau B est le paramètre structural le plus significatif de l'activité antioxydante des flavonoïdes possédant un hétérocycle saturé.
2. La présence d'une double liaison entre C₂ et C₃ en conjugaison avec la fonction 4-oxo permet une délocalisation électronique stabilisante du radical phénoxy.
3. La présence de groupement hydroxyle en position 3 en combinaison avec la double liaison C₂-C₃.

A titre d'exemple ; la quercétine et la myricétine répondent à tous ces critères nécessaires pour avoir une activité antiradicalaire efficace et importante [89].

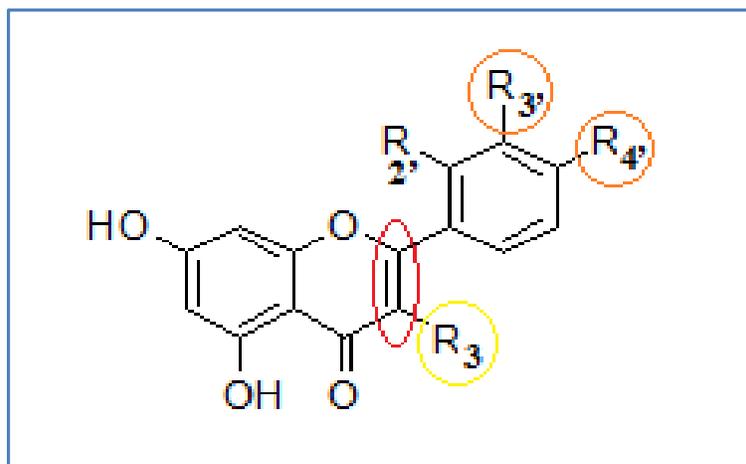


Figure 13: Éléments essentiels pour avoir une bonne activité antioxydante des flavonoïdes [90].

CHPITRE –III–

LES COMPOSÉS
TERPÉNIQUES

III. COMPOSÉS TERPÉNIQUES

Issus de plantes, de bactéries ou des champignons, les terpènes constituent un groupe de lipides présentant une grande diversité structurale.

Dans le règne végétal, les composés terpéniques sont classés dans la catégorie des métabolites secondaires. Plus de 30 000 molécules différents ont été répertoriées, ces composés forment un groupe de produits naturels largement représenté et d'un intérêt chimique considérable, très diversifiés.

Toutes ces substances dérivent en effet d'une molécule simple à 5 atomes de carbone de type isoprène [91]. On parle également de composés terpéniques ou terpenoïdes. Ils regroupent à la fois des molécules de faibles poids moléculaires, volatiles et composants principaux d'huiles essentielles, et des molécules hautement polymérisées comme par exemple le caoutchouc.

Dans la plante, les terpènes se répartissent dans tous les organes : fleurs [92,93], feuilles [94,95], écorces [91,96] et fruits [97] ou graines [91], ils sont en grande partie responsable de l'odeur suave des plantes et des fleurs et dont quelques-unes sont employées en parfumerie.

Les composés terpéniques possèdent des propriétés pharmacodynamiques très variées, en relation avec les différentes fonctions liées au squelette terpénique. Par exemples [91] : Les Pinènes sont utilisés comme Rubéfiant ; le Azulènes comme Anti-inflammatoire ; le Géraniol, Linalol et Cinéol comme Antiseptique.

III.2. Classification des composés terpéniques

Leur classification est basée sur le nombre de répétitions de l'unité de base isoprène [98-100]. Bien que de structures parfois très différentes, ces molécules contiennent toutes un nombre d'atomes de carbone multiple de cinq. Ces squelettes peuvent être arrangés de façon

linéaire ou bien former des anneaux, certains sont grands, d'autres petits, certains sont des hydrocarbures alors que d'autres contiennent aussi de l'oxygène ou de l'azote. Les différentes classes de terpènes sont :

➤ **Pour n = 2 : les monoterpènes (C10)**

Les monoterpènes sont les plus simples constituants des terpènes dont la majorité est rencontrée dans les huiles essentielles (90%), l'unité monoterpène est formée à partir de deux unités isoprènes (Figure 16).

Ces composés contiennent plus de 900 composés connus se trouvent dans trois catégories structurales : les monoterpènes linéaires (acyclique), les monoterpènes avec un cycle unique (monocycliques) et ceux avec deux cycles (bicycliques) [101]. A ces terpènes se rattachent un certain nombre de produits naturels à fonctions chimiques spéciales.

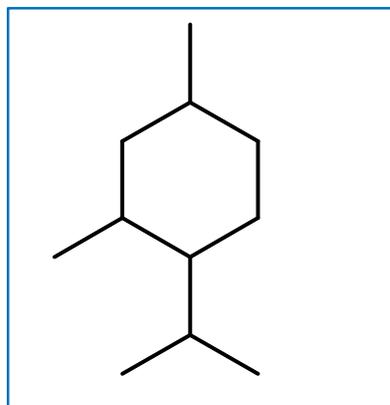


Figure 14 : Menthol.

➤ **Pour n = 3 : les sesquiterpènes (C15)**

Les sesquiterpènes, molécules en C15 (trois unités isoprène) et comme formule moléculaire $C_{15}H_{24}$. Ils se trouvent principalement dans les parties aériennes des plantes. Ils se rencontrent aussi dans les huiles essentielles ; les huiles essentielles de sarriette, cannelle, ou lavande.

Il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes qui se divisent en plusieurs catégories structurales, acycliques, monocycliques, bicycliques, tricycliques, polycycliques (Figure 17). Ces molécules ont des propriétés antiseptiques et antifongiques.

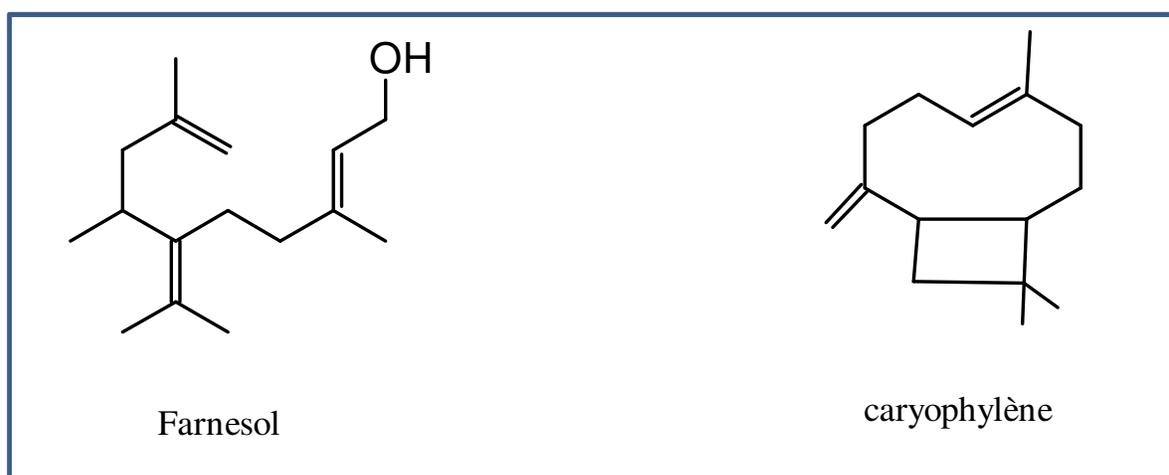


Figure 15: Exemples des sesquiterpènes.

➤ **Pour n = 4 : les diterpènes (C20)**

Les diterpènes sont des substances avec 20 atomes de carbone (quatre unités isoprène). Ces composés présentent une très grande variété structurale avec plus de 2700 diterpènes dans la nature, Ils peuvent être acycliques (Le rétinol et le rétinal), ou bi- ou tri-cycliques(la vitamine A) (Figure 18).

Les diterpènes tricycliques à noyau taxane, qui sont les plus intéressants sur le plan pharmacologique, sont issus de différentes espèces d'*ifs*, ils sont utilisés dans le traitement des tumeurs de l'ovaire résistant aux autres thérapeutiques et dans celui des cancers du poumon et du sein.

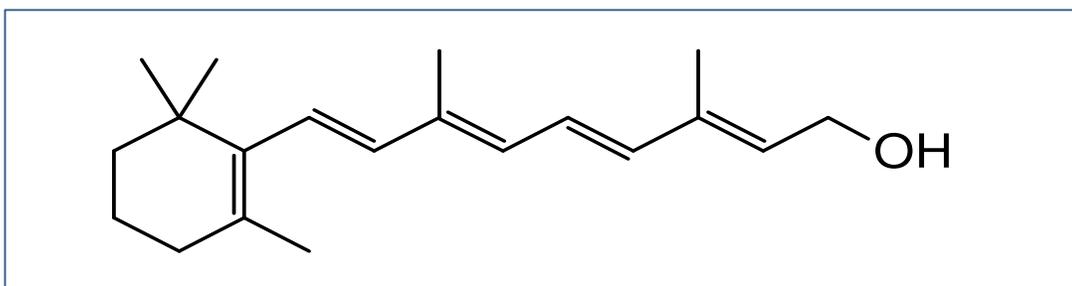


Figure 16 : Vitamine A.

➤ Pour $n = 6$: les triterpènes (C30)

Les triterpènes sont des composés en C30 (six unités isoprène) issus de la cyclisation de l'époxysqualène ou du squalène [98-100]. Ils sont presque toujours hydroxylés en position C₃.

Ils contiennent plus de 4000 composés construits sur plus de 40 squelettes hydrocarbonés différents. Les stéroïdes peuvent être considérés comme des triterpènes tétracycliques ayant perdu au moins trois méthyles. Ils possèdent des propriétés pharmacodynamiques variées : des anabolisants et des anti-inflammatoires.

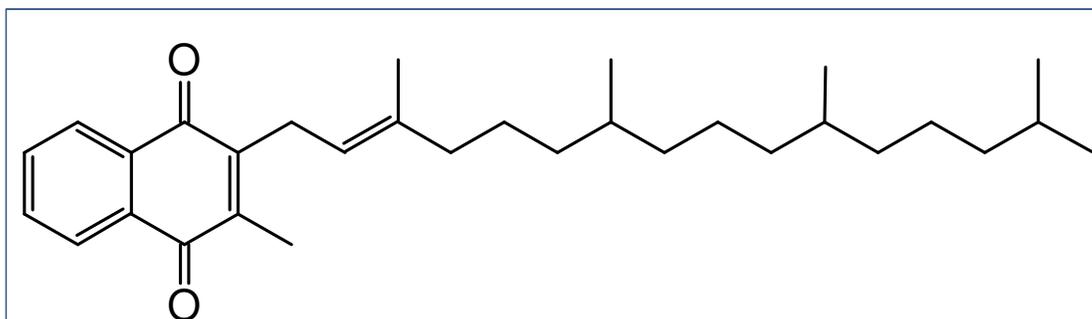


Figure 17 : Vitamine K1.

➤ Pour $n = 8$: les tetraterpènes (C40)

Les tetraterpènes constituées de l'enchaînement de 8 unités isopréniques, Les caroténoïdes sont des tetraterpènes, les plus typiques étant les apocaroténoïdes, les diapocaroténoïdes et les mégastigmanes.

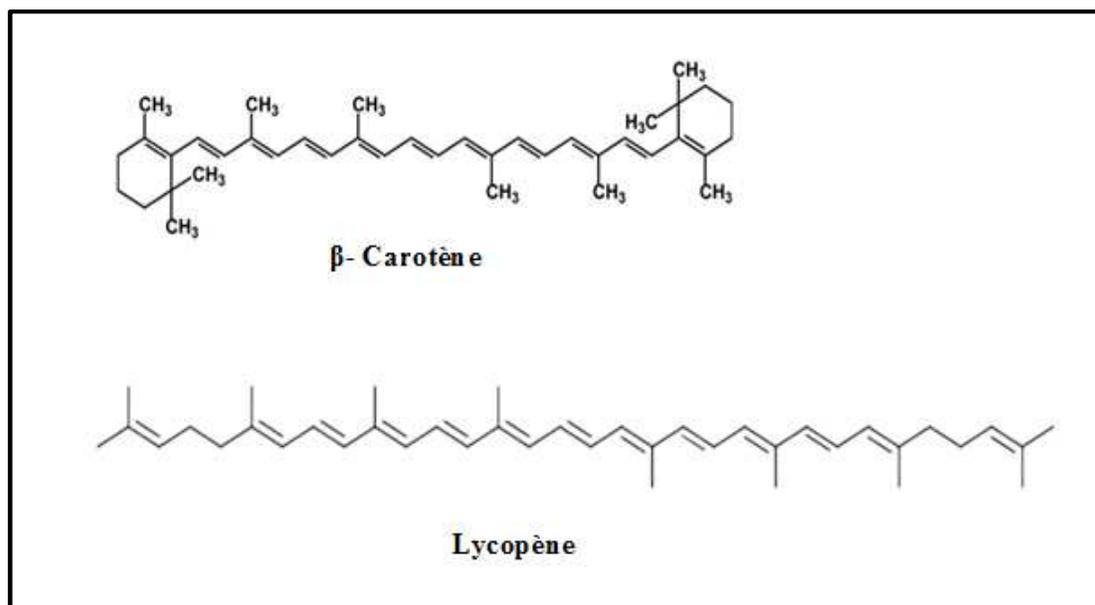


Figure 18: Exemples des tetratrènes.

➤ Pour $n > 8$: les polyterpènes

Les polyterpènes ou polyisoprènes se composent de plus de 8 unités d'isoprène. Ces terpènes hautement polymérisés (500 à 5000 unités isoprènes), ce sont les composants des latex ou le caoutchouc naturel, ils se trouvent souvent sous deux formes isomériques cis- et trans. Parmi eux, on rencontre les vitamines E, K1 et K2.

III.3. Importance des composés terpéniques

Dans le règne végétal, alors que certains terpénoïdes exercent des fonctions métaboliques primaires essentielles pour la croissance et la reproduction, la majorité fonctionne comme des métabolites secondaires et contribue à l'adaptation des espèces à leur niche écologique [102].

Depuis l'antiquité, les terpènes fournissent une gamme de produits commercialement utiles pour l'homme et certaines épices ont été utilisées pour leurs particularités de parfum, leur saveur et leur effet de conservateur [103,104].

Aujourd'hui, les tétrpénoïdes ont plusieurs usages dans différents secteurs. Ils sont largement utilisés dans le secteur de la nutrition humaine (des arômes ou saveur ex : menthol extrait de la menthe) et l'industrie du parfum (ex : santalols) [105].

La grande diversité des structures et des fonctions des terpénoïdes a provoqué un intérêt pour leur utilisation en médecine traditionnelle et moderne.

Avec la découverte des propriétés antimicrobiennes, antifongiques, antiparasitaires, antivirales, antioxydantes, antiallergènes, antispasmodiques, antihyperglycémiques et antiinflammatoires des terpènes [106], et aussi des caractéristiques anticancéreuses de certains monoterpènes [107], leur importance dans le secteur pharmaceutique a été renforcée.

CHPITRE –IV–

**LES
LIPIDES**

IV- LES LIPIDES

IV.1. Généralités sur les lipides

Les lipides (du grec *lipos*), communément appelés « graisses », sont un ensemble hétérogène de composés dont les structures chimiques et les propriétés physico-chimiques sont très différentes, contrairement aux autres familles de composés biogènes comme les protéines ou les sucres, relativement homogènes d'un point de vue chimique.

Les graisses constituent, avec les protéines et les glucides, une des trois grandes familles de macronutriments (un des constituants des aliments qui contribuent à l'apport énergétique).

Les lipides sont caractérisés par leur solubilité. Ce sont des substances insolubles dans l'eau, mais solubles dans les solvants organiques (alcool à chaud, éther, chloroforme, benzène).

Les huiles végétales sont issues de culture oléagineuse et sont composées à 98% d'un mélange de triglycérides et d'acides gras libres (figure 21). La structure de base est l'acide gras composé d'une chaîne hydrocarbonée de diverses longueurs, terminée par un radical d'acide (COOH) [108].

On différencie généralement les huiles des graisses par leur état physique (liquide ou solide) à température ambiante. Les huiles sont des corps gras liquides à la température de 15°C alors que les graisses sont plus ou moins solides à cette température [109].

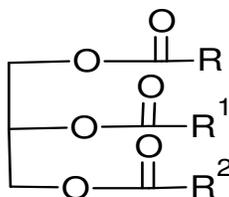


Figure 19: Formule générale d'un triglycéride d'acides gras.

IV.2. Rôle des lipides

Les lipides naturels jouent de nombreux rôles dans l'organisme :

- réserves intracellulaires d'énergie ; Ils sont utilisés par les organismes comme source ou réserve de carbone et d'énergie : les lipides fournissent la plus forte valeur énergétique (9 Kcal/g = 37,7 KJ/g), contre (4 Kcal/g = 16,7 KJ/g) pour les protides et les glucides. Ce sont les acides gras qui confèrent cette forte quantité d'énergie lors de l'oxydation des lipides.

- matériaux de structure, dans ce cas, ils sont sous forme de phospholipides, notamment comme couches de protection des cellules mais aussi comme composants essentiels des membranes cellulaires [110].

- précurseurs d'activité biologique (en faible concentration) : hormones stéroïdes, médiateurs extracellulaires et messagers intracellulaires, ils servent à transporter des vitamines (liposolubles), et jouent un rôle essentiel dans plusieurs fonctions vitales (vision, reproduction, inflammation, coagulation...).

- Ils peuvent également jouer un rôle d'isolation thermique (graisses) chez les animaux supérieurs ou d'isolation mécanique dans les cellules.

IV.3. Constituants d'un lipide

Les différentes classes de lipides ont des origines et des fonctions différentes au sein des organismes vivants (les lipides de réserve, les lipides structuraux, et les lipides du métabolisme) [111].

D'une manière générale, on classe les lipides en deux grandes catégories : les lipides à base d'acides gras et les lipides à base d'isoprène (lipides polyisopréniques).

On peut ainsi parler de deux fractions dans les corps gras [112] :

- Une fraction saponifiable (constituants majeurs) : représentant un pourcentage massique de 98 à 99%.

➤ Une fraction insaponifiable (constituants mineurs) : représentant un pourcentage massique de 1 à 2%.

La composition de chacune de ces deux fractions est mentionnée dans la figure 20.

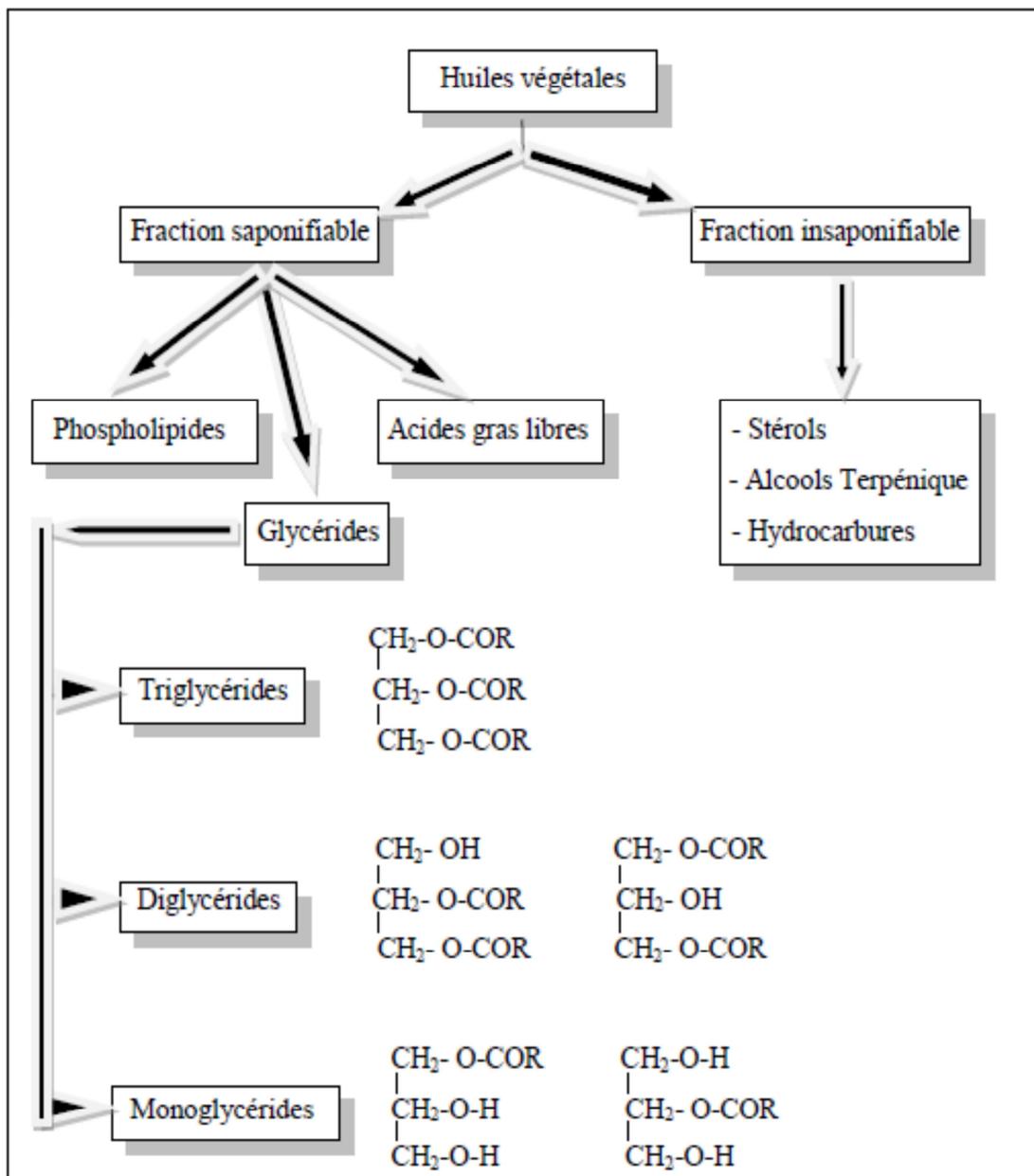


Figure 20: Constituants des huiles végétales.

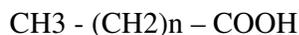
IV.3.1. Constituants majeurs

Les lipides sont majoritairement constitués d'acides gras et de triglycérides ou triacylglycérols (95 à 99% des huiles).

A. Les acides gras [113,114]

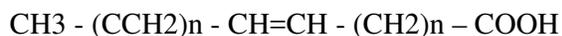
Les acides gras (AG) peuvent exister à l'état libre dans la nature. Ce sont les lipides les plus simples, les acides gras sont des composés organiques à base de carbone, d'hydrogène et d'oxygène. Ils sont formés d'un monoacide aliphatique R-COOH dont le radical R est une chaîne aliphatique de type hydrocarbure de longueur variable qui donne à la molécule son caractère hydrophobe (gras). Les AG sont classés selon leur degré de saturation.

➤ Certains acides contiennent autant d'atomes d'hydrogènes que la chaîne peut en supporter, ils n'ont que des liaisons simples, ils sont saturés(AGS) :



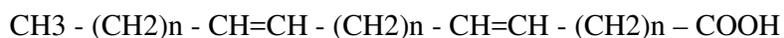
Exemple : l'acide stéarique ou l'acide palmitique.

➤ D'autres ont une double liaison, ils sont mono-insaturés (AGMI) :



Exemple : l'acide oléique.

➤ D'autres, enfin, ont deux, trois, quatre, ou plus de doubles liaisons. Ils sont polyinsaturés(AGPI) :



Exemple : l'acide linoléique.

À température ordinaire, les acides gras insaturés sont liquides (huiles) et les acides gras saturés sont solides (graisses), à l'exception des acides à chaînes carbonées courtes.

Les acides gras insaturés représentent plus de la moitié des acides gras des plantes.

B. Les triglycérols d'acides gras (TAG):

Les TAG sont des triesters résultant de la combinaison de 3 molécules d'AG par leur fonction carboxyle avec les fonctions alcooliques du glycérol (figure 21). On peut obtenir des mono-glycérides, des diglycérides, des triglycérides qui sont les plus répandus.

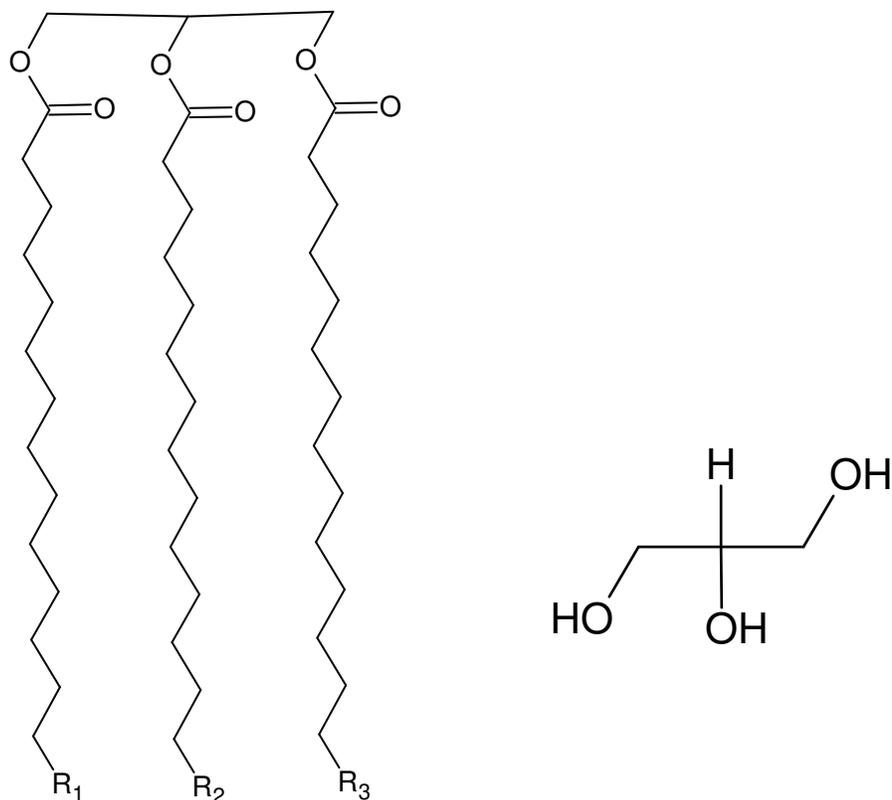


Figure 21: Glycérol et Triglycéride.

Les triglycérides sont les constituants majeurs des lipides de réserve, Ils sont considérés comme chimiquement inertes et non toxiques. Leur intérêt est tout autant lié à la nature des acides gras qu'ils renferment.

IV.3.2. Constituants mineurs

Représente l'ensemble des composants d'un corps gras qui, après saponification, sont peu solubles dans l'eau et solubles dans les solvants des graisses. Ils représentant environ 1 à 5% de l'huile, ces composés dits « **mineurs** » en raison de leur faible proportion dans la

composition chimique de l'huile, mais qui lui apportent une valeur biologique d'une grande richesse [115], tels que des phospholipides, des alcools aliphatiques et triterpéniques, des cires, des pigments, des tocophérols et des stérols [116].

A. Les hydrocarbures

Ce sont quantitativement les principaux composants de la fraction insaponifiable. Le composant majeur est le squalène qui constitue 30 à 50 % de cette fraction. C'est un hydrocarbure polyénique dont la teneur est plus élevée que dans n'importe quelle autre huile végétale ou animale [117].

B. Les stérols [118]

Ce sont des composés tétracycliques représentent environ 15 % de la fraction insaponifiable, le plus représentatif est le cholestérol (Figure. 22).

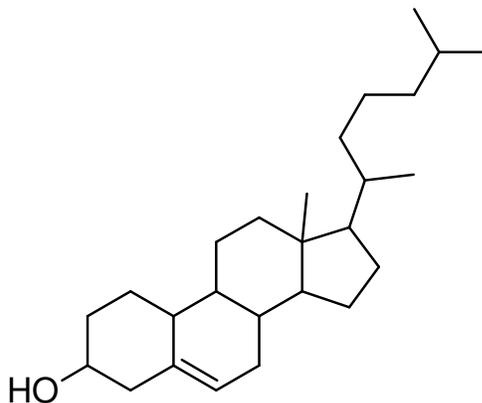


Figure 22: Cholestérol.

C. Les alcools terpéniques [115]

Ils sont présents dans l'huile à l'état libre ou bien estérifiés avec les acides gras. Parmi eux, le cycloarténol revêt un intérêt particulier : il augmente l'excrétion des acides biliaires, favorisant ainsi l'élimination fécale du cholestérol.

D. Les tocophérols [119]

Ce sont des vitamines liposolubles. Les tocophérols sont des composés importants de l'huile en raison de leur contribution à la stabilité oxydative et aux qualités nutritionnelles de l'huile. Ce sont de puissants agents antioxydants.

E. Les composés phénoliques [120]

Présents en assez grande quantité (20 à 500 mg pour 100 g), ils exercent une activité antioxydante importante.

F. Les phospholipides

Constituants essentiels des cellules vivantes, ils sont présents en très petite quantité : 5 à 15 mg pour 100 g. Ce sont des esters d'acides gras et d'acide phosphorique avec du glycérol ou d'autres alcools.

G. Les pigments [121]

➤ **La chlorophylle** : sa présence est visible car c'est elle qui donne la couleur verte de l'huile. Sa teneur est de l'ordre de 0,1 à 1 mg pour 100 g.

➤ **Les caroténoïdes** : ce sont également des pigments naturels mais à structure d'hydrocarbure. Parmi eux, on trouve le carotène (provitamine A).

IV.4. Propriétés physico-chimiques des lipides

IV.4.1. Propriétés physiques

Elles dépendent de la longueur de la chaîne carbonée et de la présence d'insaturations. Les principales caractéristiques physiques des lipides végétales sont :

➤ **Point d'ébullition**

Le point d'ébullition correspond à la température à partir de laquelle un composé passe de l'état liquide à l'état gazeux.

- Le point d'ébullition augmente lorsque le nombre de carbones augmente.
- Le point d'ébullition ne varie pratiquement pas en fonction du nombre d'insaturations.

➤ **Densité**

La densité correspond au rapport de la masse volumique du composé sur la masse volumique de l'eau dans des conditions définies. Les acides gras sont moins denses que l'eau, la densité ou poids spécifiques est de 0,915 à 0,964.

➤ **Point de fusion**

Le point de fusion correspond à la température à partir de laquelle un composé passe de l'état solide à l'état liquide. Ils permettent d'apprécier le degré de pureté des huiles, le point de fusion augmente lorsque le nombre de carbones augmente et diminue lorsque que le nombre d'insaturations augmente.

➤ **Solubilité**

La solubilité correspond à la capacité d'un composé à se dissoudre dans un solvant.

a. Dans l'eau : Les AG sont amphiphiles (chaîne aliphatique apolaire, extrémité carboxylique polaire). Seuls les AG à courte chaîne (C4, C6) sont solubles dans l'eau. Pour un nombre supérieur de carbones, ils ne sont pas solubles dans l'eau, ils flottent sur l'eau.

b. Dans les solvants organiques : Les AG sont solubles dans les solvants organiques comme l'éther, l'éthanol, le benzène,...

➤ quelques indices physiques (réfraction, absorption dans UV, viscosité, pouvoir rotatoire...).

IV.4.2. Propriétés chimiques

Des indices chimiques caractérisent les corps gras :

➤ **Indice d'acide**

L'indice d'acide correspond à la masse de KOH (en mg) nécessaire pour neutraliser l'acidité libre contenue dans 1 g de matière grasse [122-124]. La qualité d'une huile est

définie par sa quantité en acides gras libres, plus cette quantité est faible, plus la qualité de l'huile est importante.

➤ **Indice de saponification**

L'indice de saponification est le nombre en milligrammes de potasse caustique (KOH), nécessaire pour transformer en savon les acides gras libres et les triglycérides de un gramme du corps gras [124].

➤ **Indice d'iode**

L'indice d'iode correspond à la masse de d'iode I_2 (en mg) nécessaire à la saturation de toutes les doubles liaisons de 1 g de matière grasse, il permet de déterminer le degré d'insaturation d'un acide gras [125].

➤ **Indice de peroxyde**

L'indice de peroxyde indique la quantité d'oxygène actif capable de libérer l'iode des iodures. La détermination de cet indice est basée sur l'oxydation des iodures en iode par l'oxygène actif du peroxyde. Les résultats sont exprimés en milliéquivalents d'oxygène actif par kg de corps gras.

CHPITRE –V–

**ACTIVITÉS
BIOLOGIQUES**

V- ACTIVITÉS BIOLOGIQUES

V.1. Activité antioxydante

Depuis de nombreuses années l'un des soucis majeurs de l'homme est porté sur son vieillissement et sa santé. Nos cellules ne fonctionnent de manière optimale que dans des conditions bien précises de température, de pH et de concentration en oxygène et autres substrats.

L'oxygène est l'accepteur terminal d'électrons au cours de la respiration cellulaire des organismes aérobies. Il est un élément essentiel pour les organismes multicellulaires parce qu'il permet de produire de l'énergie en oxydant de la matière organique, mais il peut être également une source d'agression pour ces organismes [126]. En conditions physiologiques, le dioxygène produit au niveau de la mitochondrie des espèces oxygénées réactives (EOR) potentiellement toxiques pour l'intégrité cellulaire [127].

Ces ERO peuvent apparaître au cours des réactions enzymatiques ou sous l'effet des rayons UV, des radiations ionisantes et de métaux de transition [126].

V.1.1. Les radicaux libres

Un radical libre est une entité chimique (atome ou molécule), possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur sa couche périphérique. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se ré-apparier, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les radicaux libres peuvent être considérés comme des déchets du métabolisme cellulaire. Ce sont des atomes et des molécules dotés d'une forte énergie et qui, avant d'être neutralisés détruisent ce qu'ils rencontrent. Ils ont donc la propriété d'être extrêmement réactifs vis-à-vis des autres molécules, possédant un temps de demi-vie extrêmement court (de la nano- à la milliseconde) [128].

Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne. C'est typiquement ce qui se passe lors de la peroxydation lipidique [129,130]. Les radicaux libres sont produits dans toutes les cellules de l'organisme tout à fait normalement et en faible quantité dans les mitochondries.

V.1.2. Espèces hautement réactives

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable. Du fait de leur courte durée de vie, la plupart des radicaux libres réagissent instantanément avec d'autres molécules voisines. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense. Dans les circonstances normales, on dit que la balance antioxydants / prooxydants est en équilibre. Le stress oxydatif est défini comme étant le déséquilibre entre la génération des espèces réactives de l'oxygène et la capacité du corps à neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs [131,133].

L'exposition chronique au stress oxydant peut favoriser l'apparition de cancers et des maladies cardiovasculaires.

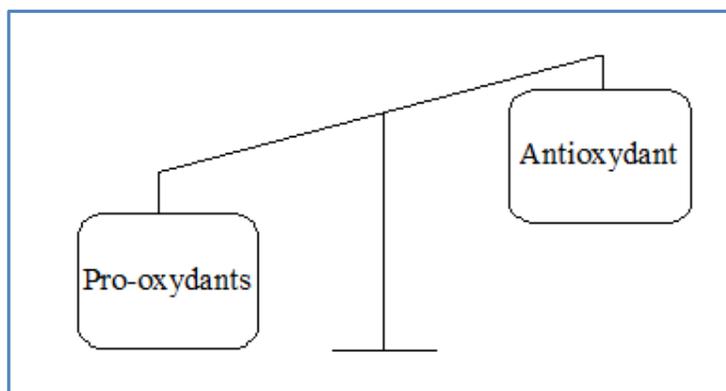


Figure 23: Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydants.

Il existe deux types de molécules réactives (les espèces réactives de l'oxygène ERO et les espèces réactives de l'azote ERN) impliquées dans le stress oxydant : les espèces radicalaires et les espèces non-radicalaires.

La réactivité d'un radical libre varie d'un radical à un autre et dépend de l'environnement où ils se trouvent [133].

L'organisme a besoin de O_2 pour produire de l'énergie, via une réduction tétravalente séquentielle de O_2 en eau au cours du processus dit de respiration mitochondriale [134]. La génération des espèces réactives de l'oxygène dénommées ROS se produit naturellement au cours de la respiration cellulaire [135]. Comme ils peuvent apparaître sous l'effet des rayons U.V, des radiations ionisantes et de métaux de transition.

Le principal danger des ERO vient des dommages qu'ils peuvent provoquer lorsqu'ils réagissent avec (lipides, protéines [136], ADN [137], glucose, ...).

Cette oxydation provoque la dégradation des biomolécules [138], accélérant le vieillissement (maladies cardiovasculaires et neuro-dégénératives, cancer, diabète...) [139].

Les espèces réactives de l'oxygène incluent non seulement des radicaux libres dérivés de l'oxygène dont les plus courants : l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), radical hydroxyle (OH^{\bullet}), radical hydroperoxyde (HO_2^{\bullet}), radical peroxyde (ROO^{\bullet}), radical alcoxyle (RO^{\bullet}), mais aussi des dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante l'oxygène singulet (1O_2 ou $^{\bullet}O-O^{\bullet}$), peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), peroxyde d'azote ($ONOO^-$) qui ne sont pas réactives mais peuvent être des précurseurs de radicaux [140].

Tous les radicaux libres ne sont pas seulement des dérivés de l'oxygène (figure 24), Les espèces radicalaires azotées sont apparues au cours de la dernière décennie, par exemple le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}) a pris une place considérable en biologie [129,132,141], il est paradoxalement impliqué dans de nombreuses pathologies telles que le diabète, l'athérosclérose, le cancer et les lésions neuronales dégénératives.

L'espèce non radicalaire azotée est caractérisée par sa grande faculté de diffusion dans les membranes cellulaires et sa réactivité moyenne (de l'ordre de quelques secondes *in vivo*),

le monoxyde d'azote radicalaire peut aisément réagir avec la plupart des espèces oxygénées. La forme protonnée du radical peroxynitrite (**ONOOH**) est un puissant agent oxydant causant des dommages importants similaires à ceux observés avec **OH[•]** [142].

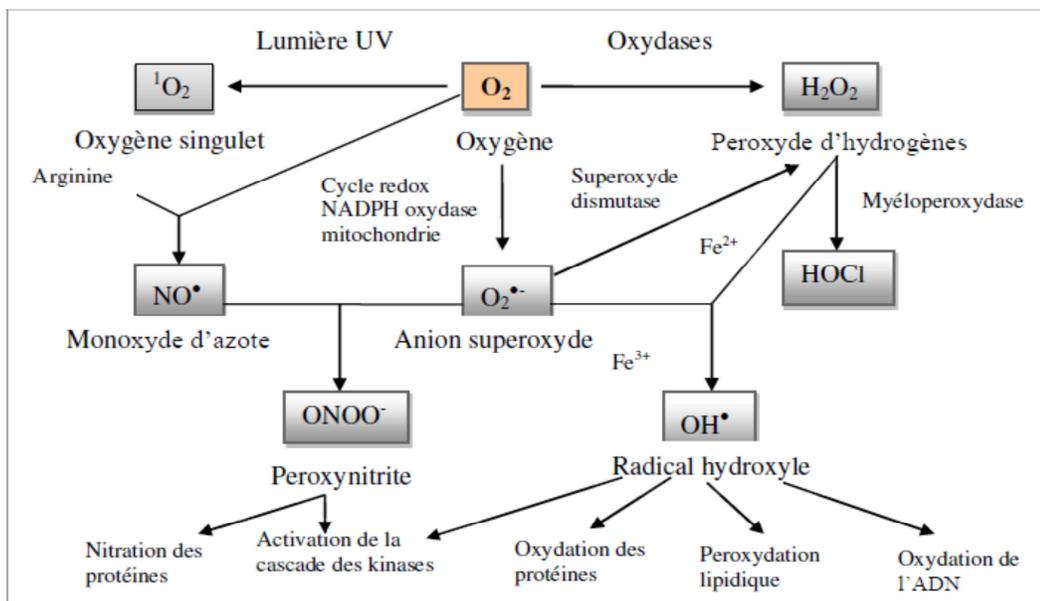


Figure 24 :Formation des différentes espèces réactives ; ERO et ERN. [128].

V.1.3. Les antioxydants

Beaucoup d'espèces oxydantes sont produites et bien qu'elles soient souvent indispensables à l'organisme, elles ne sont pas moins responsables de dégâts importants.

Pour lutter contre les produits oxydants délétères, le corps humain possède tout un arsenal de défenses que l'on qualifie d'antioxydants.

On désigne par antioxydant toute substance qui, lorsqu'elle est présente en faible concentration comparée à celle du substrat oxydable, retarde ou prévient de manière significative l'oxydation de ce substrat [143,144]. L'antioxydant peut agir en supprimant les ERO ou en empêchant leur formation ou encore en réparant les dommages causés par ceux-ci [145].

D'un point de vue biologique les composés antioxydants sont la stratégie préventive la plus prometteuse contre la formation des cataractes [146].

V.1.3.1. Principaux antioxydants

Notre organisme réagit de façon constante à la production permanente de radicaux libres, il possède des systèmes de défense très efficaces, de deux types : les antioxydants endogènes ou enzymatiques et les antioxydants exogènes ou non enzymatiques.

Ces antioxydants sont d'autant plus importants que certains peuvent être utilisés en thérapeutique pour tenter de prévenir le stress oxydatif [147].

A. Antioxydants endogènes

La production physiologique d'ERO, est régulée par des systèmes de défense composés d'enzymes. L'organisme humain possède un système enzymatique, constitué principalement de trois enzymes pour la destruction des espèces réactives de l'oxygène [148]. Ils sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les ERO.

Les enzymes les plus efficaces chez les mammifères ainsi que chez les plantes sont la superoxyde dismutase, la catalase et le glutathion peroxydase [149,151].

Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire [72].

1. Les superoxydes dismutases

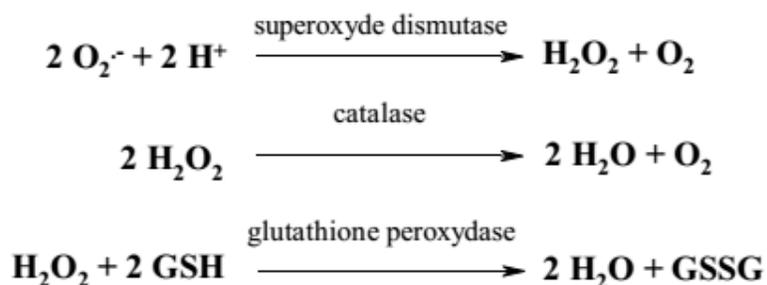
Le rôle majeur du superoxyde dismutase ou SOD est de catalyser la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire [151]. Ils sont des métalloprotéines dont le site actif contient du cuivre, du zinc, du manganèse, du fer ou du nickel. Ils catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène [152-155].

2. La catalase

La catalase, transforme le peroxyde d'hydrogène (présent à haute concentration) en simple molécule d'eau permettant l'élimination de celui-ci [156-158].

3. Les glutathions peroxydases

La glutathion peroxydase possède une forte affinité pour le peroxyde d'hydrogène et, par conséquent, catalyse l'élimination de H_2O_2 même présent à de très faibles concentrations [158].



B. Les antioxydants exogènes

De nombreuses molécules issues de notre alimentation sont considérées comme des antioxydants. On peut citer les plus connus et les plus importants ci-dessous :

1. Les médicaments

Ils constituent une source importante d'antioxydants. Actuellement, les classes thérapeutiques comme les bêta-bloquants, les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les antihyperlipoprotéïnémiques, montré des propriétés antioxydantes [159].

Certains médicaments (exemple du probucol (lurselle)) fait diminuer le taux du cholestérol dans le sang.

La N- acétylcystéine agit dans la régénération du glutathion en pénétrant les cellules.

Le Captopril, l'Hydralazine, et le Terazosin sont des médicaments utilisés contre l'hypertension artérielle, favoriseraient dans certaines conditions la production d'enzymes antioxydantes.

2. Les vitamines

A. La vitamine C

La vitamine C ou acide ascorbique (figure 25) est un cofacteur d'enzymes, elle fut découverte en 1924 par Szent-Györgyi et sa synthèse fut réalisée en 1934, à partir du glucose. C'est un antioxydant hydrosoluble [134], sensible à la chaleur, aux ultraviolets et à l'oxygène.

La vitamine C est un puissant réducteur. Elle peut réduire le radical α -tocophérol et ainsi permettre une meilleure efficacité de la vitamine E [160-162]. Elle se trouve dans les légumes, les choux, le poivron, le persil, les agrumes et le kiwi [163].

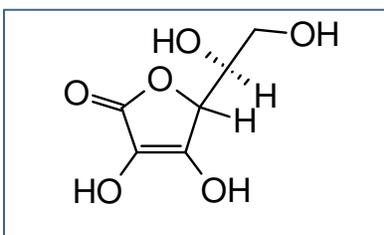


Figure 25: Structure de la vitamine C.

B. La vitamine E

La vitamine E désigne un groupe de nombreux composants présents dans la nature : les α -, β -, γ - et δ -tocophérols et tocotriénols (figure 26) [162].

C'est un antioxydant liposoluble, elle se localise entre les chaînes d'acides gras des phospholipides qui constituent les membranes et les lipoprotéines. Elle semble devoir fixer le radical hydroxyle avec formation d'une molécule d'ouverture de cycle. Le tocophérol est considéré comme étant le plus important inhibiteur de la peroxydation lipidique.

La vitamine E est rencontrée surtout dans les huiles végétales, (arachides, soja, chardon, tournesol, maïs, olive pressé à froid), les amandes, les noix, les graines, le lait, les œufs, les poissons, les légumes à feuilles vertes [163-166].

Elle a été largement étudiée comme complément alimentaire potentiellement préventive dans les maladies cardiovasculaires et les maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer) [167].

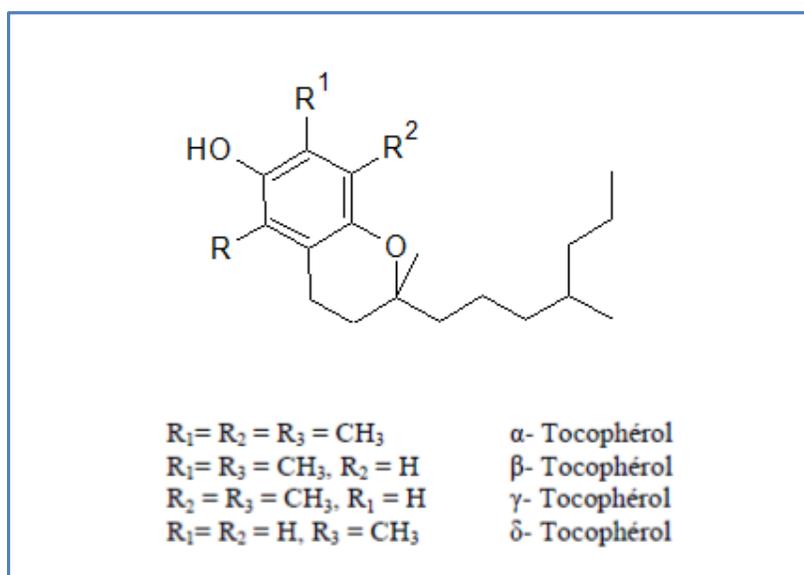


Figure 26: Structures des tocophérols.

C. β -carotène

Parmi les photo-protecteurs actifs, le β -carotène (figure 27) apparaît comme un piègeur très efficace. Il est doué de plusieurs capacités :

Il est précurseur de la vitamine A [168,169], possède la capacité de capter (d'inactiver) l'oxygène singulet [164]. Il protège aussi les structures cellulaires contre l'agression oxydante : s'oppose à la génotoxicité de nombreux agents [170].

La présence de nombreuses doubles liaisons au sein de leurs structures en fait des antioxydants reconnus, notamment par leur effet protecteur vis-à-vis des radiations solaires [171].

Il est présent dans les légumes verts, la salade, les carottes, l'abricot, le melon, les épinards, le potiron et d'autres fruits jaunes [172,163].

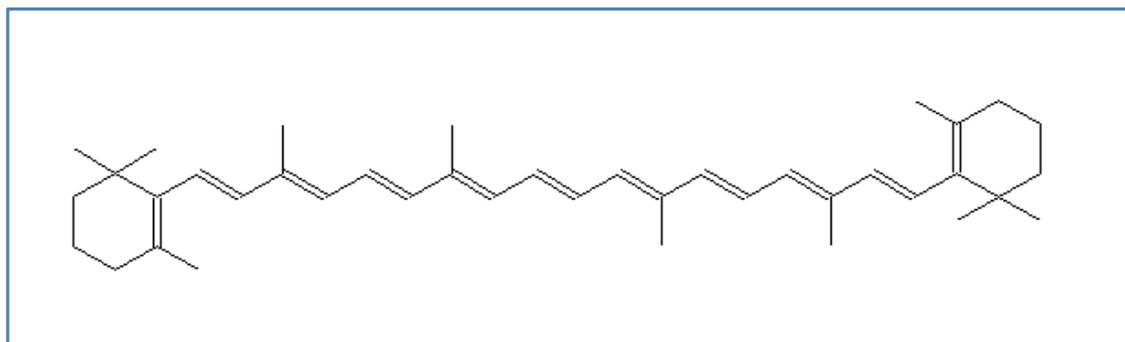


Figure 27: structure de β -carotène.

3. Antioxydants naturel

Plusieurs molécules à propriétés antioxydantes sont isolées des plantes [173,174]. Ils sont présents dans toutes les parties des plantes supérieures. Ce sont des composés phénoliques, les plus représentés sont les coumarines, les flavonoïdes, les tanins dérivés d'acide phénolique [7].

A. Les coumarines

Ils sont capables d'avertir la peroxydation des lipides membranaires comme ils ont la capacité de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes, et peroxydes. [171].

B. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent la classe la plus étudiée, Les relations structure-activités anti-oxydantes des flavonoïdes et des composés phénoliques ont montré que l'activité anti-oxydante était déterminée par la position et le degré d'hydroxylation.

Ils agissent par deux mécanismes d'action : soit par chélation des métaux (quercétine, catéchine), soit par capture des radicaux hydroxyles, superoxydes, alkoxyles et peroxydes [175]. On les retrouve dans les fruits, les légumes et le thé [163].

C. Les tanins

Les tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation.

Les tanins hydrolysables et procyanidines présentent des propriétés antioxydantes remarquables. Ils inhibent également l'autooxydation de l'acide ascorbique et du linoléate ; et la peroxydation lipidique des mitochondries du foie et des microsomes. Ces tanins sont de très bons capteurs de radicaux libres. Ils sont donneurs de protons aux radicaux lipidiques produits lors de la peroxydation, des radicaux tanniques plus stables sont alors formés [176].

D. Les phénols

Les acides phénoliques, comme l'acide rosmarinique, sont fortement antioxydants et anti-inflammatoires et peuvent avoir des propriétés antivirales [143].

V.1.3.2. Mécanismes d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, un antioxydant peut agir contre un radical libre par différentes manières, Leur mécanismes d'action sont divers :

- le captage de l'oxygène singulier
- la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente,
- la réduction de radicaux ou de peroxydes,
- la chélation des métaux de transition ce qui a pour effet de ralentir les réactions de

Fenton [177,178].

V.1.3.3. Evaluation de la capacité antioxydante par des tests *in vitro*

Les antioxydants peuvent réduire les radicaux primaires par deux mécanismes : par transfert d'électron singulet ou par transfert d'atomes d'hydrogène. Les méthodes ABTS, DPPH et PPM jouent sur le transfert d'électron singulet, alors que la méthode ORAC joue sur le transfert d'un atome d'hydrogène issu de phénomènes d'oxydations [179].

Les méthodes les plus utilisées, en particulier pour les tests *in vitro* chimiques, pour analyser les extraits des plantes et de fruits sont la méthode ABTS et la méthode DPPH.

Les résultats de l'activité antioxydante sont généralement exprimés en fonction d'une molécule de référence possédant de forte propriété antioxydante connue sous le nom de Trolox qui est un analogue hydrosoluble de la vitamine E et la vitamine C.

V.2. Activité antimicrobienne

Une des approches courantes pour la recherche des substances biologiquement actives est le criblage systématique des micro-organismes ou les plantes, qui sont des sources de beaucoup d'agents thérapeutiques utiles.

Dès la naissance, L'homme se trouve dans un entourage qui est plein de petits êtres vivants (micro-organismes ou microbes), qui vont progressivement coloniser son revêtement cutanéomuqueux. Pour résister à ces micro-organismes de nombreux moyens sont mis en jeu. On peut schématiquement en distinguer 3 groupes : les barrières anatomiques, les mécanismes de résistance naturelle (ou innés) et l'immunité acquise [180].

Ces dernières années, il y a eu un grand intérêt pour la découverte de nouveaux agents antimicrobiens, due à une augmentation alarmante du taux des infections avec les micro-organismes résistant aux antibiotiques. Vu leurs petite taille, ils sont échappé de l'observation, ils ne sont donc visible qu'au microscope. Les micro-organismes peuvent être divisés en quatre grands groupes [181] :

- Les bactéries
- Les virus
- Les levures et les champignons « mycoses »
- Les protozoaires [182].

V.2.1. Les bactéries

Les bactéries sont définies historiquement comme des micro-organismes vivants unicellulaires (formé d'une seule cellule), visible au microscope (de 0,5 μm à 1 μm de largeur et de 0,5 à 0,8 μm de longueur) et appartenant à une zone de transition entre le règne animal et le règne végétal.

Parmi les organismes unicellulaires, nous trouvons des procaryotes (les archéobactéries et les eubactéries) et des eucaryotes (les protistes et certains champignons dont les levures). Elles sont présents un peu partout ; l'air, l'eau, les sols, la peau, etc. Elles peuvent survivre de façon indépendante, se nourrir et se multiplier comme elles sont dotées d'un grand pouvoir d'adaptation [181].

La plupart des bactéries se nourrissent de déchet organique en décomposition (plantes mortes animaux), ce sont les saprophytes ou les mangeurs de déchet.

La majorité des bactéries présentes naturellement chez l'homme ne causent pas d'effets néfastes à la santé. Certaines sont même essentielles autant à l'organisme humain qu'à l'environnement, comme les bactéries présentes dans les intestins qui aident à digérer. D'autres bactéries, par contre, sont bel et bien des véritables agents pathogènes qui provoquent toujours une maladie [183].

V.2.2. Les antibiotiques

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. Ces derniers sont des substances qui en faible quantité ont la capacité soit de

détruire les bactéries (effet bactéricide), ou d'inhiber leur croissance (effet bactériostatique) [184]. Au sens strict, les antibiotiques sont des produits élaborés par des micro-organismes, mais on inclut généralement parmi eux les dérivés semi-synthétiques et les produits entièrement synthétiques.

Un antibiotique possède les caractéristiques suivantes :

- Toxicité sélective pour les bactéries ou les mycoses.
- Mécanisme d'action précis avec une cible spécifique dont il bloque la fonction physiologique.
- Actif en milieu organique et capable de diffuser.

La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents peut entraîner la sélection de souches multi-résistantes 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 (les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins) [185,186].

V.2.3. Les bactéries étudiées

A. *Pseudomona aeruginosa*

Le genre *pseudomonas* est fait de bacilles mobiles aérobies stricts, se cultive facilement sur les milieux usuels. C'est une bactérie gram-négative, ces bacilles fins sont de 1.5 à 3 µm de long et 0.5 à 0.8 µm de large et droits. Ce germe est ubiquitaire du sol, de l'air de l'eau ou sur les végétaux. On le trouve souvent dans l'environnement hospitalier, surtout dans les endroits humides. *Pseudomona aeruginosa* (ou bacille pyocyanique) se caractérise par la pigmentation bleu-vert de ses colonies [187]. Il s'agit de bactéries résistantes pour plusieurs antibiotiques [188].

Elle est responsable de 10 % de l'ensemble des infections nosocomiales, occupant le 3^{ème} rang après *E. coli* et *S. aureus*, mais le 1^{er} rang pour les infections pulmonaires basses et le 3^{ème} rang pour les infections urinaires [189].

B. *Salmonella typhimurium*

Salmonella (bacille à Gram négatif) est la première cause de toxi-infections alimentaires collectives bactérienne dans le monde, elle est l'une des préoccupations majeures des laboratoires de contrôle de qualité alimentaire. *S. Typhimurium* est largement répandue dans les différents réservoirs animaux (porcs, bovins, volailles...) et dans certaines denrées destinées à l'homme [190].

C. *Escherichia coli*

C'est une bactérie à gram négatif [191], apparentant à la famille des *Entérobactérie*, souvent mobiles, mais parfois immobiles, isolées pour la première fois par Thomas Escherich en 1855. C'est l'espèce dominante de la flore aérobie du tube digestif.

Sa longueur varie de 2 à 6 μm , alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 μm [192]. *E. coli* est la bactérie la plus fréquemment impliquée dans les infections urinaires. Elle peut aussi provoquer des diarrhées par des mécanismes très divers, ainsi que diverses infections communautaires ou nosocomiales [193].

Escherichia coli (*E. coli*) se développe sur gélose ordinaire, fermente le glucose, le mannitol et le lactose avec production importante de gaz. La présence d'*E. coli* dans l'environnement est le témoin d'une contamination fécale. C'est pour quoi on procède systématiquement à sa détection dans les eaux d'alimentation [194].

D. La levure *Candida albicans*

Les levures sont typiquement unicellulaires, quoique très souvent les cellules restent collées les unes aux autres après la division cellulaire [195].

Candida albicans est l'espèce de levure la plus connue du genre *Candida*. Au laboratoire médical, la culture en boîte pétri donne des colonies qui sont grandes, rondes, de couleur blanche ou crème. Le genre *Candida* comprend 81 espèces de champignons lévuriformes. *Candida albicans* est la plus souvent à l'origine de la plupart des manifestations pathologiques chez l'homme. C'est un champignon fréquemment retrouvé au niveau de la bouche, sur la peau, et du tractus gastro-intestinal de plusieurs personnes normales.

Parmi les conditions favorisant une infection à candida, notons le diabète, la grossesse, les antibiotiques, les cortico- stéroïdes et toute maladie pouvant affecter l'état général d'un individu. La nystatine (Mycostatin) est très efficace dans le contrôle des infections muco-cutanées [196]. Cette espèce est responsable de plus de 80 % des infections connues sous le terme de candidose, comme les infections superficielles cutanées, infections superficielles muco- cutanées [197].

E. *Staphylocoques aureus*

Les espèces *Staphylococcus aureus* sont des cocci à Gram positif, de forme sphérique, avec un diamètre de 0.8 à 1 μm . Elles sont regroupées en diplocoques ou en petits amas (grappe de raisin) [198]. Ce type de bactéries sont immobiles, sporulés, habituellement sans capsule. De nombreuses souches de *Staphylococcus aureus* produisent un pigment jaune doré [187]. Elles sont la cause de la méningite, l'ostéomyélite et la diarrhée [188].

Staphylococcus aureus est un germe aérobie - anaérobie facultatif [198], doit son nom d'espèce à l'aspect pigmenté de ses colonies. Il développe rapidement des résistances aux antibiotiques et les souches hospitalières ne sont souvent sensibles qu'aux glycopeptides [18]. Cette espèce (staphylocoque doré), tient une place très importante dans les infections communautaires et nosocomiales [199]. Elle représente l'agent commun des infections postopératoires de blessures, endocardite aigue, intoxication alimentaire [200].

Les symptômes de l'intoxication à *staphylocoques* sont :

- Altération de l'état général et Fièvre élevée,
- Nausées ou vomissements,
- Douleurs abdominales et musculaires,
- Mal de gorge, Diarrhée et Céphalées (maux de tête),
- Apparition d'une plaque rouge caractéristique, apparaissant dans les deux jours après

le début de la maladie et susceptible de se généraliser. Quelquefois, elle est confinée à une seule zone

F. *Klebsiella pneumoniae*

Les *Klebsiella* sont des *Enterobacteriaceae* bacilles gram négatif, immobiles et capsulés qui fermentent le glucose. Ce sont des bactéries ubiquitaires présentes dans le tube digestif et dans l'appareil respiratoire des Hommes et des animaux en tant que bactéries commensales. Elles sont fréquentes dans les selles et peuvent être un indicateur d'une contamination fécale. Elles sont abondantes dans le sol, les eaux et sont des fixateurs de l'azote atmosphérique.

Klebsiella pneumoniae détermine des infections respiratoires (pneumonies, abcès pulmonaires, pleurésies), des infections intestinales. Elle est également responsable d'infections nosocomiales.

G. *Enterobacter*

Enterobacter est un genre de bactérie appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. Il s'agit d'un bacille à coloration de Gram négatif, mobiles, mesurant 0,6 à 1 µm de diamètre et 1,2 à 3 µm de longueur, leur température optimale de croissance est de 30°C. L'*Enterobacter* est reconnue par sa résistance aux agents antibactériens.

La famille des *Enterobacteraceae*, comprenant de nombreuses espèces, Ils peuvent être isolés à partir d'infections urinaires ou de plaies, et pouvant être pathogènes pour l'homme. Les souches du genre *Enterobacter* sont souvent responsables d'infections nosocomiales (l'une des bactéries les plus fréquemment impliquées dans les infections respiratoires et urinaires nosocomiale).

V.2.4. Méthodes d'étude de l'activité antibactérienne

L'antibiogramme (ATB) a pour but de déterminer les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) d'une souche bactérienne vis-à-vis des divers antibiotiques. Par définition (O.M.S), la CMI est la plus faible concentration d'antibiotique capable de provoquer une inhibition complète de la croissance d'une bactérie donnée, appréciable à l'œil nu [201], après une période d'incubation donnée. La détermination de cette valeur est peu précise mais elle est consacrée par l'usage et elle bénéficie d'une masse importante d'informations recueillies à son sujet [202].

Les méthodes utilisées pour évaluer l'activité antimicrobienne *in vitro* sont nombreuses et donnent parfois des résultats différents selon les conditions expérimentales adoptées par chaque manipulateur. Deux genres de techniques sont utilisables :

A. Méthode de diffusion

Les disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé (milieu de Müller Hinton) préalablementensemencé avec une suspension de bactéries. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose, sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration). Après incubation du milieu de culture (18 h à 37 °C), on constate que chaque disque est entouré d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des

microorganismes s'arrête là où il existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la concentration minimale inhibitrice (CMI) [203].

On mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur approchée de la CMI de l'agent antimicrobien vis à vis de la souche étudiée (l'aire circulaire qui entoure le disque et qui ne montre aucune culture visible permet de mesurer le diamètre d'inhibition qui indique le degré de sensibilité de la bactérie) [204].

B. Méthode de dilution

C'est la méthode de référence, qui peut être pratiquée en milieu solide et liquide, lorsque la mesure de la CMI est effectuée selon une technique en milieu liquide, on distribue dans un premier temps, dans une série de tubes à hémolyse stériles (ou dans les capsules d'une plaque), sous un même volume, des concentrations décroissantes d'antibiotique que l'on ensemence avec un inoculum calibré de la souche étudiée. Après 18 à 24 h d'incubation à 37°C, la plus faible concentration de la gamme produisant l'inhibition de la culture microbienne est qualifiée de CMI.

Le principe de la technique en milieu solide est identique, différentes concentrations d'antibiotiques sont incorporées dans une série de boîtes qui contiennent un milieu nutritif solide par la présence de gélose. L'intérêt de cette technique en milieu solide réside dans la possibilité d'étudier un grand nombre de souches bactériennes [203].

CHPITRE –VI–

ÉTUDE PHYTOCHIMIQUE DES
ESPÈCES ETUDIÉES

VI- ÉTUDE PHYTOCHIMIQUE DES ESPÈCES ETUDIÉES

VI.1. La famille des *Euphorbiacées*

VI.1.1. Position systématique de la famille des *Euphorbiacées*

Les *Euphorbiacées* sont l'une des familles les plus vastes et les plus cosmopolites, cette famille de plantes à fleurs comprend environ 300 genres pour environ 10 000 espèces [204-207].

C'est la 4^{ème} famille par ordre d'importance au plan mondial après les *Astéracées*, les *Fabacées* et les *Orchidacées*. Ce sont des plantes cosmopolites, mais essentiellement tropicales, subtropicales [208]. Elles possèdent généralement dans leurs tissus une substance laiteuse caractéristique de la famille.

La famille *Euphorbiacée* et plus spécifiquement le genre *Euphorbia* L. n'est pas assez connue sur le plan systématique. Des tendances à la division se manifestent souvent. Par exemple Webster [209] a élaboré la classification botanique suivante :

Taxon : *Rhizophytes*

Embranchement : *Spermaphytes*

Sous-embranchement : *Angiospermes*

Classe : *Dicotylédones*

Sous-classe : *Dialypétales*

Série : *Thalamiflores*

Sous-série : *Méristémones*

Ordre : *Tricoques*

Famille : *Euphorbiaceae*

Sous-famille : *Euphorbiadeae*.

VI.1.2. Caractères morphologiques généraux de la famille des *Euphorbiacées*

La famille des *Euphorbiacées* comprend des arbres, des plantes arborescentes, des buissons, des lianes, et des plantes herbacées annuelles ou vivaces [210,208].

Cette famille possède généralement dans leurs tissus une matière visqueuse de couleur blanche, lait perlant à la cassure appelée latex, irritant pour les yeux et provoquant des rougeurs sur la peau.

L'*Euphorbiacée* pousse partout, sauf dans les régions antarctiques et les sommets des hautes montagnes [211]. Cette famille est très hétérogène, les plantes qui la constituent varient à la fois par leur appareil végétatif ainsi que par la structure de leurs fleurs [204,211].

Les fleurs sont déclines et rarement isolées, chez certains genres réunies en inflorescences appelées cyathes (une fleur femelle entourée de quelques fleurs mâles) comme dans le genre *Euphorbia*.

La fleur est cyclique, achlamyde ou haplochlamyde et dans ce cas, actinomorphe et sépaloïde, trimère ou pentamère, hypogyne et unisexuée. Les sépales, lorsqu'ils sont présents, sont libres ou soudés par la base. Fleurs mâles peut compter de 0 à un nombre indéfini de sépales et avec une à plusieurs étamines, fleurs femelles elles aussi généralement dépourvue de pétales, compte de 0 à un nombre indéfini de sépales, et à ovaire surmonté de 3 styles et triloculaire (d'où le nom de tri-coques donné aussi à cette famille).

Les feuilles, de formes très variables, sont généralement alternées et simples, opposées ou verticillées, entières ou finement dentées [204,208], souvent très réduites chez les espèces succulentes. Certains genres et espèces possèdent cependant des feuilles opposées et palmées. Des glandes sécrétrices sont généralement présentes sur le pétiole, le limbe et la marge du limbe.

Les fruits tiennent une place importante dans la classification générique de la famille, Ils se présentent généralement sous forme d'une capsule à 2 ou 3 loges tri-coque, à un schizocarpe à déhiscence explosive. La graine est albuminée et caronculée [204,208].

VI.1.3. Présentation du genre *Euphorbia*

L'*Euphorbia* vient du latin *Euphorbia*, plus avant de *Euphorbus*, nom du médecin grec du roi Juba II de Mauritanie, au 1^{er} siècle avant Jésus Christ, et conservé par Linné [212].

Les plantes du genre *Euphorbia* sont connue par leur noms vernaculaires « bouhliba », qui signifie plante à sève laiteuse [213], ce genre constitue un groupe numériquement très important. C'est le genre le plus représentatif de la famille des *Euphorbiacées* avec presque 2000 espèces connues [204, 208, 212].

Les *Euphorbes* qui s'inscrivent dans le genre *Euphorbia* L, sont des végétaux de forme et de taille très variable, caractérisés par une inflorescence très particulière (*cyathium*), et par la présence d'un suc laiteux (liquide blanc) collant et irritant appelée latex (Figures 28 et 29). Elles sont présentes dans pratiquement tous les milieux écologiques sauf dans les sommets des hautes montagnes.

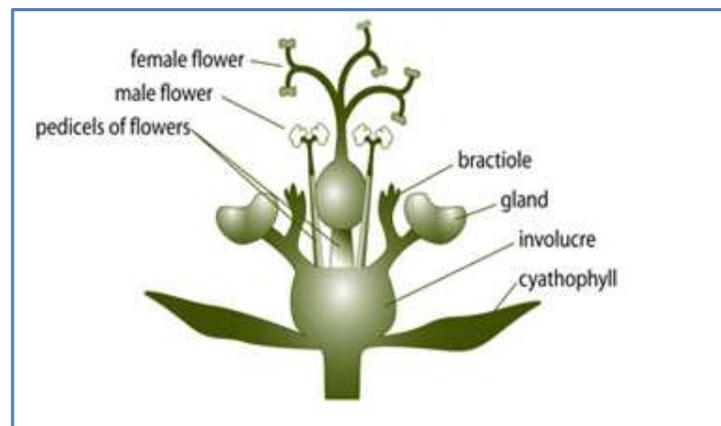


Figure 28: Schéma d'un cyathium.



Figure 29: Latex.

Chez les espèces du genre *Euphorbia* des caractéristiques générales permettant de reconnaître une plante appartenant à cette famille : [27,206, 214,215].

Plantes herbacées, arbustes et de nombreuses plantes succulentes ressemblent à première vue à des cactées.

- **Les tiges :** courtes, couchées, très ramifiées, étalées en cercle sur le sol.
- **Les feuilles :** simples et opposées, rarement stipulées.
- **Les fleurs :** ont une structure quasiment identique, des mercuriales disposées en grappes plus ou moins allongées se limitant à un stigmate et une étamine, toujours vert vif.
- **Les fruits :** capsule à 2-3 coques (tricoque) explosif, chacune renfermant une graine [216].

VI.I.4. La toxicité du genre *Euphorbia*

Un grand nombre d'espèces d'*Euphorbiacées*, sont toxiques pour l'homme et les animaux aussi [19].

Les plantes du genre *Euphorbia* exsudent un latex blanc depuis toutes leurs parties qui apparaît à la cassure (tiges, feuilles, fruit et racines). Ce latex voisin du caoutchouc, l'*euphorbone* (C₁₅H₂₄O) [217] est toxique : corrosif, purgatif et provoque des rougeurs sur la

peau, des érythèmes ou des phlyctènes [213]. Egaleme nt très irritant pour les yeux, il entraîne par simple contact, réputé pour faire disparaître les verrues. Une fois absorbé, le latex entraîne des symptômes plus ou moins sévères de gastro-entérite et d'inflammation des muqueuses du tube digestif [213].

Cette grande toxicité est liée à la présence d'esters diterpéniques (des esters de phorbol) de structure complexe (tiglianes, daphnanes, ingénanes) [218,219].

VI.1.5. Utilisation en médecine traditionnelle

Du fait de l'origine polygénétique des *Euphorbiacée* et leur grande diversité tant botanique que chimique [220] les plantes *Euphorbiacées* sont largement et universellement utilisées dans le traitement d'un bon nombre de maladies [213,221].

Le genre *Euphorbia* a fait l'objet de nombreux travaux scientifiques mettant en évidence des activités variées : anti-tumoral, apoptotique, cytotoxique, antivirale, antibactérienne, antifongique (Tableau 2).

Tableau 2: Activités biologiques du genre *Euphorbia*.

Nom scientifique	parties utilisées	Activités	références
<i>E. myrsinites</i>	Latex	Anthelminthique	222-223
<i>E. heteradena Jaub.</i>	Latex	Anti-constipation	224
<i>Euphorbia sp</i>	latex, tiges	Anti-constipation	225
<i>E. peplus</i>	Latex	Antibactérienne	226
<i>E. chamaesyce</i>	partie aérienne	anti-tumorale	227
<i>E. tirucalli</i>		anti-arthrite	228
<i>E. thymifolia</i>		Antivirale	229
<i>E. wallichii</i>	Racines	cytotoxique et antibactérienne	230
<i>E. hirta</i>	partie aérienne	antalgique et anti-inflammatoire	231
<i>E. guyoniana Boiss</i>	Latex	Antivirale	213
<i>E. polyacantha</i>	ige	anti- inflammatoire	232
<i>E. helioscopia</i>	Latex	Antiscorbutique	233
<i>E. milii</i>	partie aérienne	Analgésique	234
<i>E. pulcherrima L</i>	Latex	Allergique	235

VI.2. ESPECES ETUDIEES

VI.2.1. *Euphorbia biumbellata*

1. Taxonomie

La classification botanique d'*Euphorbia biumbellata* Poir est résumée sous forme d'arbre phylogénique [236].

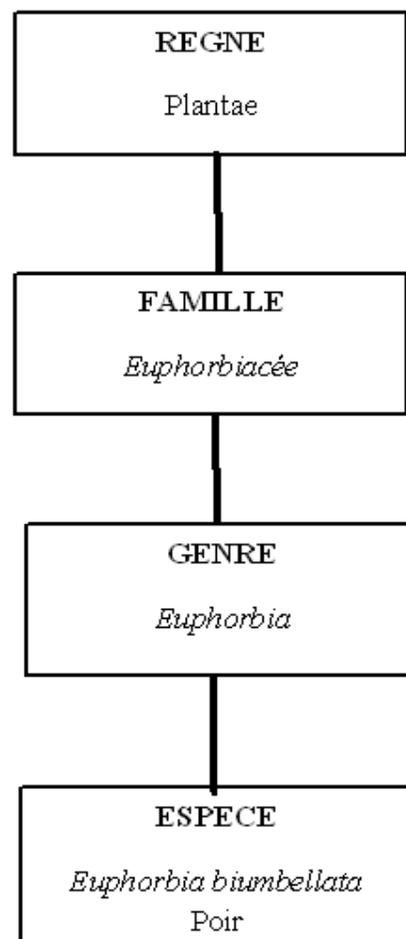


Figure 30: Classification de l'espèce *Euphorbia biumbellata*.

2. Nomenclature

Le nom scientifique de l'espèce est *Euphorbia biumbellata* Poir [237], et appelé également Euphorbe à double ombelle en français, et Clustered Spurge en anglais.

3. Présentation et description

Cette euphorbe se rencontre partout dans la région méditerranéenne (Sables et coteaux du littoral méditerranéen). C'est une espèce vivace de 30-80 cm, glabre, à souche épaisse avec des feuilles étroitement lancéolées, tiges droites, simples, herbacées, dressées, raides, terminées par 2 ou 3 ombelles semblables, superposées séparées par un espace nu et bien définies dans la partie supérieure de la tige. Il fleurit en Avril - juin [237]



Figure 31: *Euphorbia biumbellata* (photo prise par F.Zeghad, 2014).

4. Données phytochimiques

Contrairement à d'autres espèces similaires du genre *Euphorbia* (*E. helioscopia*, *E. hirta*.) qui ont fait l'objet de nombreuses études, *Euphorbia biumbellata* est l'une des espèces les moins étudiées. Cette plante n'a jamais fait l'objet d'une étude ou investigation chimique ou biologique préalable.

Par contre, plusieurs études phytochimiques ont été réalisées pour identifier les différents composés chimiques chez *Euphorbia hirta*. Ces analyses ont montré la présence des flavonoïdes, tannins, triterpènes, huiles essentiels et phytosterols [238-242].

Cette plante est utilisée en médecine traditionnelle en raison de ses différentes propriétés pharmacologiques : cytotoxique, pro-apoptotique [243], antitumorale [239], antimicrobienne [244,245], et antioxydante [246]

L'étude phytochimique et biologique réalisée par Ogbulie en 2007 [247], a montré que l'extrait éthanolique d'*Euphorbia hirta* présente une bonne activité antibactérienne et toxicologique.

E. hirta est une plante médicinale qui a été traditionnellement utilisée dans le traitement de nombreuses maladies : la plante entière a été utilisée pour lutter contre la fièvre, la bronchite [248], et la diarrhée [249]. Les feuilles fraîches ont été utilisées dans le traitement des affections de la peau [247].

E. helioscopia .L a été intensivement étudiée, différents types de métabolites secondaires, tels que triterpèneoïdes , diterpénoïdes, des flavonoïdes, des tanins et des lipides ont été isolés de cette espèce [250-252].

Basé sur des enquêtes ethnobotaniques ; il a été enregistré que *E. helioscopia* est utilisé comme vermifuge et purgative [253].

En outre, le suc laiteux des feuilles et tiges fraîches sont utilisées pour libérer le pus [254]. Ainsi comme un antiscorbutique et diaphorétique [255]

La plante entière a une grande importance médicinale, souvent utilisé pour traiter l'ascite, l'œdème, la tuberculose pulmonaire, la teigne, le paludisme, la dysenterie bacillaire et l'ostéomyélite lymphoïde tuberculeuse cervicale [256-259].

Les graines mélangées avec poivrons rôtis ont été utilisés dans le traitement du choléra [260].

Cette plante aussi connu comme espèces toxiques qui causent la diarrhée, la fatigue générale, la dysenterie, le vertige et l'anoxie [261].

VI.2.2. *Euphorbia dendroides* L.

1. Taxonomie

La figure 34 donne la classification botanique d'*Euphorbia dendroides*, cette classification est présentée sous forme d'arbre phylogénique [262].

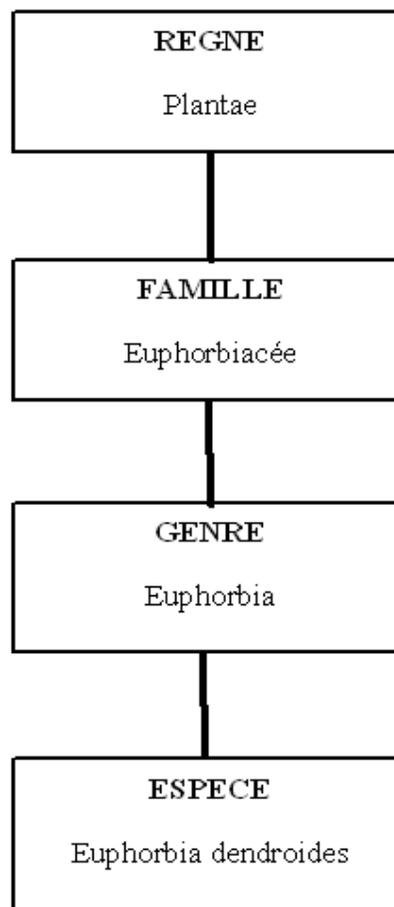


Figure 32: Classification de l'espèce *Euphorbia dendroides*.

2. Nomenclature

Le nom scientifique donné à l'espèce est *Euphorbia dendroides* L. il est parfois nommé Euphorbe arborescente ou arbustive en français, et Tree Spurge en anglais [262].

3. Présentation et description

La plante se présente comme un arbuste d'une taille de l'ordre du mètre, pouvant atteindre exceptionnellement 2 à 3 mètres. Les rameaux ne sont feuillés qu'à l'extrémité, le long de la pousse de l'année.

La floraison se produit en mars-avril. Sa distribution est strictement eu-méditerranéenne.

D'une manière très générale, la plante se rencontre sur des roches calcaires, les graines mûrissent jusqu'en août, ou les fruits secs explosent en projetant les graines.



Figure 33: *Euphorbia dendroides*.

4. Données phytochimiques

Plusieurs études phytochimiques ont été réalisées sur les différentes parties de *Euphorbia dendroides* pour identifier les différents composés chimiques chez ce genre.

Ces analyses ont montrés la présence des n-alcanes, cire d'esters, des aldéhydes, des acides gras, des alcools primaires, des triterpènes et des esters de l'acide benzoïque. Ces composés ont été isolés à partir des feuilles par Giilz [263].

Les travaux de Corea [264], puis Barile [265] ont montré que le latex d'*Euphorbia dendroides* est riche en composés terpéniques (di-terpènes à squelette jatrophone, jatrophanes modifiés et des di-terpènes), et qu'il possède un pouvoir cytotoxique important.

D'autres analyses ont montré aussi que le latex de l'*Euphorbia dendroides* est une source riche des Protéases, et qu'il a une activité proteolytique [266].

une autre étude réalisée par Bankovic [267] sur les diterpènes lactones isolés d'*Euphorbia dendroides* a montré qu'ils ont une activité anti-tumorale significative.

Plus récemment, il a été mentionné que les terpènes du genre *dendroides* possèdent une modeste in-Vitro activités anti-tumoral, pro-apoptotique [244], et une bonne activité anti-P-glycoprotéine [268].

Les extraits éthanoliques des feuilles, des tiges et des racines d'*Euphorbia dendroides* ont manifesté une activité antibactérienne sur les souches à Gram +, Gram - et les souches fongiques [269].

En ce qui concerne les graines, elles sont riches en acides gras ; Myristique, Palmitique, Stearique, Oleique, Linoléique, Linoléique, Arachidique, Behénique, α -Tocopherol et γ -Tocopherol [270].

VI.2.3. *Euphorbia terracina*

1. Taxonomie

La classification botanique d'*Euphorbia terracina* peut être résumée sous forme d'arbre phylogénique.

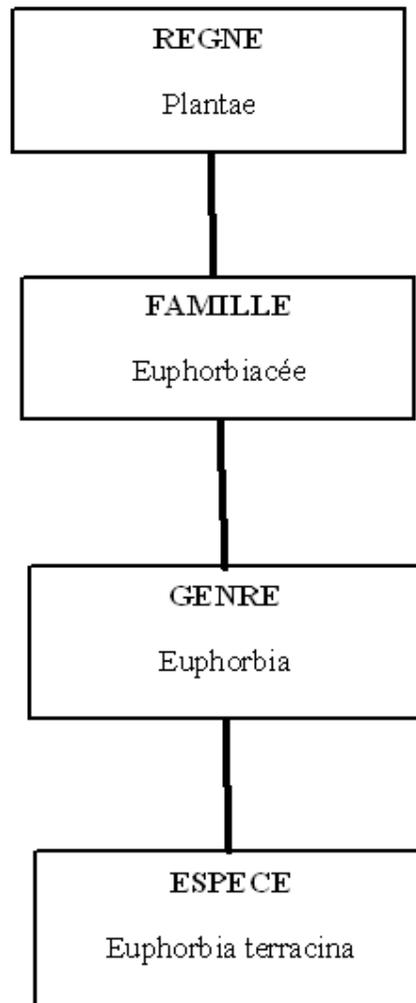


Figure 34: Classification de l'espèce *Euphorbia terracina* [271]

2. Nomenclature

Le nom scientifique de la plante est *Euphorbia terracina* .et appelé aussi *Euphorbe de Terracine* en français, et *Coastal Spurge* en anglais [272].

3. Présentation et description

Plante vivace de 10-50 cm, glabre, à souche épaisse ; tiges nombreuses, dressées ou couchées-diffuses, simples ou à quelques rameaux florifères sous l'ombelle ; feuilles

nombreuses, ovales, ombelle à 2-5 rayons plusieurs fois bifurques ; capsule de 3-4 mm, trigone, glabre et lisse ; graines ovoïdes-tronquées, blanchâtres, lisses.

Elle se rencontre dans la région méditerranéenne, Il fleurit en Avril à septembre [273]



Figure 35: *Euphorbia terracina*.

4. Données phytochimiques

Les travaux phytochimiques effectuées sur l'espèce *Euphorbia terracina* ont montré que les extraits des feuilles et de la plante entière contiennent : des tannins, des saponines, des traces des alcaloïdes [274] et des coumarines [275].

Cette plante contient également des composés terpéniques [275]. Parmi les composés terpéniques isolés, nous citerons une étude effectuée sur les parties aériennes de l'espèce *E. terracina*. [276] qui a permis d'isoler et de caractériser des diterpènes lactones (Figure 36).

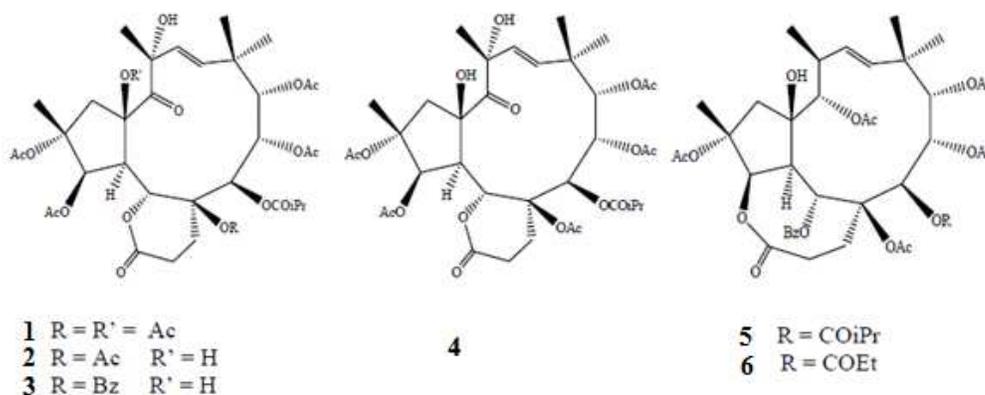


Figure 36: Composés terpéniques isolés d'*Euphorbia terracina*.

1: 13 α -hydroxyterracinolide B; **2:** 13 α -hydroxyterracinolide G ; **3 :** 15-O-deacétyl-13 α -hydroxy-terracinolide A; **4:** 13 α -hydroxyterracinolide I; **5:** isoterracinolide A; **6:** isoterracinolide B

Des extraits réalisés avec différentes parties d'*Euphorbia terracina* ont montré des propriétés pharmacologiques significatives (cytotoxique, pro-apoptotique, et antitumorale) [244, 277, 278].

En ce qui concerne l'activité antibactérienne l'extrait méthanolique des feuilles d'*Euphorbia terracina* a manifesté une activité antibactérienne sur les *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, et *Bacillus cereus* [274].

DEUXIÈME PARTIE

PARTIE

EXPÉRIMENTALE

CHPITRE –I–

**MATÉRIELS ET
MÉTHODES**

I. MATERIELS ET METODES

I.1. Matériels végétaux

La cueillette des plantes a eu lieu durant le printemps 2014, auprès du parc national d'El Kala, dans le nord-est Algérien [279]. Les matériels végétaux utilisés au cours de notre étude sont : *Euphorbia biumbellata* (Spécimen herbier **005_48**), *Euphorbia dendroides* (Spécimen herbier **005_49**) et *Euphorbia terracina* (Spécimen herbier **006_04**). Ces plantes ont été authentifiées par le Docteur T. Hamel, botaniste du Département de Biologie, Université Badji Mokhtar-Annaba, l'Algérie. La partie aérienne (graines et feuilles) de chaque plante a fait l'objet de notre investigation.

Une fois récoltées, les plantes sont lavées séparément et séchées à la température ambiante dans un endroit sec et aéré, à l'abri de la lumière pour éviter la perte des substances actives.

Après séchage les différents organes sont finement broyés et mise en poudre à l'aide d'un broyeur à marteaux. La poudre obtenue pour chaque espèce est stockée dans des bocaux fermés et conservée à l'ombre.

I.2. Réactifs chimiques et appareillage

Tous les produits chimiques et les solvants sont de qualité analytique, généralement achetés auprès de Sigma-Aldrich ou Fluka (Allemagne). Les standards purs utilisés lors de l'identification par GC-MS et LC-MS ont été obtenus chez Sigma-Aldrich (Allemagne), Pyrant Bertrand (France) ou Roth (Allemagne).

Les différents appareils utilisés pour nos analyses sont les suivants :

- un spectrophotomètre UV-Vis (Varian Cary 50 scan).

- un appareil LC-MS Shimadzu de modèle LCMS-2020 équipé d'une chaîne HPLC couplée à un détecteur en masse de type quadripôle.
- un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectrophotomètre de masse (GC-MS).

I.3. Screening phytochimique

Le screening phytochimique est une technique qui permet de mettre en évidence la présence ou l'absence d'un certain nombre de groupes chimiques contenus dans un organe végétal.

Dans notre travail, les essais phytochimiques ont été réalisés selon les techniques classiques décrites par Harborne [280]. Les résultats seront classés selon :

- test très positif : (+ + +).
- test positif : (+ +).
- test faiblement positif : (+).
- test négatif : (-).

Les groupes phytochimiques majeurs qui ont été déterminés sont les suivants :

Les alcaloïdes, les flavonoïdes, les tannins, les saponines, les cardénolides, les anthocynes, les stérols et les terpènes.

Les différents protocoles sont décrits ci-dessous.

1) Test des Alcaloïdes

Nous avons procédé à une macération sous agitation pendant 2 h de 2 g de la poudre végétale dans 40 ml de HCl dilué à 1%. Ce mélange est ensuite filtré. Dans un tube à essai, introduire 5ml de filtrat et ajouter quelques gouttes de réactif de Mayer. L'apparition d'une turbidité ou d'un précipité blanc jaunâtre indique la présence des alcaloïdes.

2) Test des Flavonoïdes

Macérer 2g poudre pulvérisée de la matière végétale dans 40ml de HCl dilué 1% pendant 24h. Après avoir filtré le mélange, prendre 2 ml du filtrat, le rendre basique par l'ajout NH_4OH .

L'apparition d'une couleur jaune claire dans la partie supérieure du tube indique la présence des flavonoïdes.

3) Test des Tanins

La présence des tanins est mise en évidence en prenant 2g de poudre végétal, les macérer dans 20 ml d'une solution hydro-alcoolique chaude de $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ à 1% pendant 2 heures, le mélange est filtré sur papier filtre puis tester le filtrat avec quelques gouttes d'une solution de FeCl_3 à 2% (2g FeCl_3 dans 100ml de $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$). En présence de tanins, il se développe une coloration verdâtre (tanins catéchiques) ou bleu – noir (tanins galliques).

4) Test des Saponines

Test de mousse : On introduit 2g de matériel végétal dans une fiole renfermant 50ml de H_2O , on maintient à l'ébullition pendant 5 minutes puis on filtre le mélange et on laisse refroidir.

Quelques millilitres du filtrat sont mis dans un tube à essais puis la solution est fortement agitée pendant environ 30 secondes puis on laisse reposer quelques secondes. L'apparition d'une mousse indique la présence des saponines.

- Pas de mousse = test négatif
- Mousse moins de 1 cm = test faiblement positif
- Mousse de 1-2 cm = test positif
- Mousse plus de 2 cm = test très positif.

5) Test des Cardénolides

Macérer 2g de la poudre pulvérisées dans 40ml d'eau distillée pendant 2h.

Filtrer et prélever 10 ml du filtrat, l'extraire avec un mélange de 10 ml de CHCl_3 et de $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$.

Evaporer la phase organique et dissoudre le précipité dans 3ml de CH_3COOH . Ajouter 3 à 4 gouttes de FeCl_3 à 2% suivi de 0,5ml de H_2SO_4 concentré sur les parois du tube à essai. L'apparition d'une couleur vert-bleu dans la quantité d'acide indique la présence des cardénolides.

6) Test des Anthocyanes

Ce test repose sur le changement de la couleur de l'infusé à 10% avec changement du pH. On ajoute à 1 ml de l'infusion quelques gouttes de HCl pur, On a un changement de la couleur (l'apparition d'une coloration rose- rouge). On rajoute quelques gouttes de NH_4OH , le changement de la couleur une deuxième fois (bleu violacé) indique la présence des anthocynes.

7) Stérols et terpènes

1 g de drogue sèche est mis à macérer en flacon bouché avec 20ml d'éther de pétrole ou du toluène pendant 24 h. Le résidu obtenu après filtration et évaporation est dissous dans l'anhydride acétique. L'addition d'une goutte de H_2SO_4 pur développe, en présence de produits stéroliques ou terpéniques, une coloration mauve ou marron virant au vert.

8) Lipides

On met 50 ml d'hexane sur 3g de poudre. On laisse le mélange au repos pendant 24 heures. Après filtration, Le solvant est évaporé sous pression réduite à 40°C . L'extrait obtenu est un extrait lipidique brut (huile).

I.4. Dosages des composés phénoliques

L'étude quantitative des extraits bruts au moyen des dosages spectrophotométriques avaient pour objectif la détermination de la teneur totale des polyphénols totaux, des flavonoïdes, et des tanins. Trois courbes d'étalonnages ont été tracées pour cet objectif et réalisées pour chaque type de dosage (figures 1, 2 et 3). Les résultats en équivalent acide gallique, catéchine ou quercétine selon le cas, sont exprimés en g/100g de matière sèche.

I.4.1. Dosage des polyphénols totaux (PPT)

Pour le dosage des polyphénols totaux, nous avons utilisé la méthode de Folin-Ciocalteu [281].

A. Préparation des extraits

1 g de poudre de matière végétale est extrait avec 10 ml d'eau distillé, éthanol, méthanol, et de méthanol-eau (7:3) pendant 24 heures dans l'obscurité. Le filtrat obtenu est utilisé pour l'analyse.

B. Principe

Le réactif utilisé « Folin - Ciocalteu » est constitué par un mélange de complexes des acides phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) de couleur jaune.

Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des composés phénoliques par ce réactif et la formation d'un nouveau complexe de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) [282], de couleur bleu. Cette coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle aux taux de composés phénoliques présents dans le milieu donne un maximum d'absorption à 750 nm. [7]. Le dosage de PPT se fait par la comparaison de l'absorbance de la solution étudiée à celle obtenue par un étalon de concentration connue qui est l'acide gallique.

C. Mode opératoire

Le protocole utilisé au laboratoire est basé sur celui décrit par Kim et al, [283] en y apportant quelques modifications :

1ml d'extrait de plante convenablement dilué ou la solution d'acide gallique (10, 20, 40, 60, 80, 100 mg/L) est introduit dans une fiole jaugée de 25 ml contenant initialement 9 ml d'eau distillée. On ajoute ensuite 1 ml du réactif de Folin et on agite. Après 5 min, une solution de Na_2CO_3 à 7 % (10 ml) est ajoutée tout en agitant. La solution est immédiatement diluée et ajustée au trait de jauge avec de l'eau distillée et le mélange est agité vigoureusement.

Après une incubation de 90 min à 23°C et à l'abri de la lumière, l'absorbance est lue à 750 nm avec un blanc fait à partir d'eau distillée à l'aide d'un spectrophotomètre.

La teneur des composés phénoliques est exprimée en g équivalent d'acide gallique EAG / 100 g du poids sec de matière sèche. Tous les essais sont réalisés en triplicata.

La teneur en polyphénols des échantillons analysés sont déterminées par la relation suivante :

$$\text{Teneur en polyphénols (mg / 100 g)} = 100 (C V) / m.$$

C : Concentration de l'extrait.

V : Volume de solvant utilisé pour l'extraction (en litres).

m : Masse en grammes de la prise d'essai.

I.4.2. Dosage des flavonoïdes totaux (FVT)

L'estimation de la teneur en flavonoïdes totaux des extraits par la méthode colorimétrique est faite selon la méthode utilisée par Kim et al [283] avec quelques modifications.

A. Préparation des extraits

1 g de poudre de matière végétale est extrait avec 10 ml d'eau distillé, éthanol, méthanol, et de méthanol-eau (7:3) pendant 24 heures dans l'obscurité. Le filtrat obtenu est utilisé pour l'analyse.

B. Principe

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium en présence de la soude.

Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des flavonoïdes par ces réactifs, elle entraîne la formation d'un complexe brunâtre qui absorbe dans le visible à 510 nm. La comparaison de la D.O (densité optique) observée à celle obtenue par un étalon de catéchine de concentration connue permet d'évaluer la teneur totale en flavonoïdes.

C. Mode opératoire

Les flavonoïdes totaux sont évalués par colorimétrie. La méthode consiste à placer d'une manière successive dans des fioles jaugées de 10 ml contenant au préalable 4 ml d'eau distillée, l'extrait convenablement dilué (1ml) ou la solution du composé étalon, quercétine (20, 40, 60, 80, 100 mg/l).

A l'instant $t = 0$, on y introduit 0,3 ml de NaNO_2 à 5 % (p/v). A $t = 5$ mn on y ajoute 0,3 ml de AlCl_3 à 10 % ; 6 minutes après, on y ajoute 2 ml de NaOH à 1M. Immédiatement le mélange réactionnel est dilué avec 2,4 ml d'eau distillée et agiter vigoureusement. L'absorbance de la solution rose est déterminée à 510 nm contre un blanc (contenant du méthanol) à l'aide d'un spectrophotomètre. La teneur en flavonoïdes totaux des différentes parties des trois plantes est exprimée en équivalents de g de quercétine par 100 gramme de

plante sèche (g EQ/ 100g Ms). Tous les essais sont reproduits au moins trois fois dans les mêmes conditions.

La teneur en flavonoïdes des échantillons analysés sont déterminées par la relation suivante :

$$\text{Teneur en flavonoïdes totaux (mg / 100 g)} = 100 (C V) / m.$$

I.4.3. Dosage des tannins condensés (TC)

A. Principe

Les tanins condensés sont estimées en utilisant la méthode de vanilline en milieu acide [284,285]. Cette méthode est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins condensés en présence d'acide. Les tanins condensés réagissent avec la vanilline pour produire un complexe coloré (vert) mesuré à 500 nm.

B. Mode opératoire

Pour évaluer ces tanins condensés, 5 g de matière sèche ont été lixiviés dans le n-hexane, le résidu obtenu est séché à température ambiante. Ensuite, un mélange formé de 0,5 g de résidu avec 15 ml d'une solution de méthanol-HCl (1 %) est préparé dans un tube à essai. Le mélange obtenu est vortexé puis placé dans un bain-marie à 35°C pendant 20 minutes sous agitation.

Après incubation et centrifugation, le surnageant est récupéré. 1 ml du filtrat est prélevé et mélangé avec 3 ml d'une solution de la vanilline/méthanol-HCl (4%, m/v). Cette dernière est formée de 4 g de vanilline et 100 ml de méthanol-HCl (8%).

Toutes les solutions ainsi que les blancs sont préparés dans les mêmes conditions.

Les tubes obtenus sont de nouveau incubés et laissés réagir à 35°C pendant 20 minutes. Après la deuxième incubation l'absorbance de chaque solution obtenue est directement mesurée à 500 nm.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif. Ce qui permet d'exprimer la concentration des tannins condensés en g équivalent de catéchine par 100 g de matière sèche (g EC / 100g MS).

I.5. Identification des composés phénoliques (LC-MS)

La LC-MS est une méthode d'analyse qui permet de combiner les qualités de séparation de la chromatographie liquide avec les capacités de détection de la spectrométrie de masse. Ceci permet de faciliter l'identification et/ou la quantification de nombreuses substances.

A. Préparation des extraits

La méthode consiste à macérer la matière végétale (1g) dans le méthanol/H₂O :7/3. Le mélange est mis en agitation pendant 24 heures puis centrifugé et filtré à travers un filtre (PTFE) de 0,45 µm. L'extrait hydro-méthanolique obtenu est conservé à 4°C jusqu'à l'utilisation.

B. Paramètres de séparation

L'appareil LC-MS Shimadzu de modèle LCMS-2020 est équipé d'un chaîne HPLC couplée à un détecteur en masse de type quadripôle. La colonne Gemini C18 phase inverse utilisée possède les caractéristiques suivantes : diamètre de particules 3 µm, diamètre interne 4.6 mm, longueur de colonne 150 mm.

Paramètres de séparation en chromatographie :

- Volume d'injection : 20 μ L
- Débit : 0,6 mL/min
- Colonne thermostatée à 30°C
- Phase mobile à deux voies (A) eau acidifiée à 0.5% avec de l'acide formique et (B) acétonitrile.

C. Gradient d'élution

Le gradient d'élution mis en place est le suivant :

- 0-15 min : gradient linéaire 90:10 à 50:50
- 15-16 min : gradient linéaire 50:50 à 10:90
- 16-20 min : élution maintenue à 10:90
- 20-21 min : gradient linéaire 10 :90 à 90 :10
- 21-25 min : élution maintenue à 90:10

Ce gradient permet d'obtenir une bonne séparation des composés étudiés. Il comprend en outre une phase de rinçage puis une phase de rééquilibrage de la colonne. Les composés sont élués par degré de polarité décroissante.

D. Paramètre d'ionisation et de détection

- température de source : 350 °C
- température de la ligne de désolvatation : 250 °C
- tension de spray : -4 kV
- gaz de nébulisation : 1,5 L/min
- gaz de séchage : 10 L/min

La détection est réalisée en mode négatif en full scan de 0 à 1000 Da. Après identification des composés, la quantification est faite en mode SIM (Selected Ion Monitoring) afin d'augmenter la sensibilité.

I.6. Etude de la composition chimique des huiles fixes (GC-MS)

La GC-MS (Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse) est une technique d'analyse qui permet d'une part de séparer des composés d'un échantillon en phase gaz puis de les détecter et de les identifier en fonction de leur rapport m/z .

Pour réaliser l'étude de la composition chimique des huiles nous avons utilisé un GCMS de type Perkin Elmer-MS Clarus 500. La phase stationnaire est formée de 5% de diphényle et 95% de diméthyle polysiloxane. Le gaz vecteur utilisé est l'hélium dont le débit est de 0,75 ml/min. Le gradient de température du four varie de 150 °C à 300 °C avec une augmentation de 10 °C par minute.

Le détecteur utilisé pour l'enregistrement des spectres est couplé à un spectromètre de masse quadripôle avec une gamme qui varie entre 40 et 600 m/z avec 0,1 scan/s et une énergie d'ionisation d'électrons de 70 eV. La température de la source, de la ligne de transfert et du détecteur est de 250 °C.

- **Paramètres de séparation**

La GC-MS Shimadzu utilisée est de modèle GC-2010 Plus constitué d'un détecteur de type quadripôle.

La colonne ZB-5MS apolaire utilisée a les caractéristiques suivantes : 30 mètres de longueur, 0,25 mm de diamètre interne et 0,25 mm d'épaisseur de film.

- Les conditions d'analyse GC-MS sont les suivantes :
- débit du gaz vecteur (hélium) : 1 mL/min

- volume injecté : 2 μL
- injection en mode split
- température de l'injecteur : 300 °C
- gradient de température : 60 °C pendant 3 min ; rampe de 10 °C/min jusqu'à 300 °C maintenue pendant 3 min (30 min au total)
- ionisation par impact électronique (IE) à 70 eV
- température de source : 200 °C.

Les composés détectés au sein des huiles ont été identifiés grâce à une bibliothèque de spectres de masse basée sur la fragmentation de composés de référence (base de données NIST 11). Pour les hypothèses d'identification des pics, les spectres avec les taux de similitude les plus élevés sont retenus puis comparés avec les données disponibles dans la littérature pour les plantes étudiées.

I.6.1. Extraction de l'huile fixe

L'extraction des huiles fixes est réalisée avec de l'hexane comme solvant. 50g de graines pulvérisées mises en macération dans 200 ml d'hexane pendant 24 h. Après filtration, le solvant est évaporé au Rotavapeur sous pression réduite à 40 °C. L'huile résiduelle qui va être conservée au frais (+4°C) dans de petits piluliers en verre et utilisée pour le reste du travail analytique.

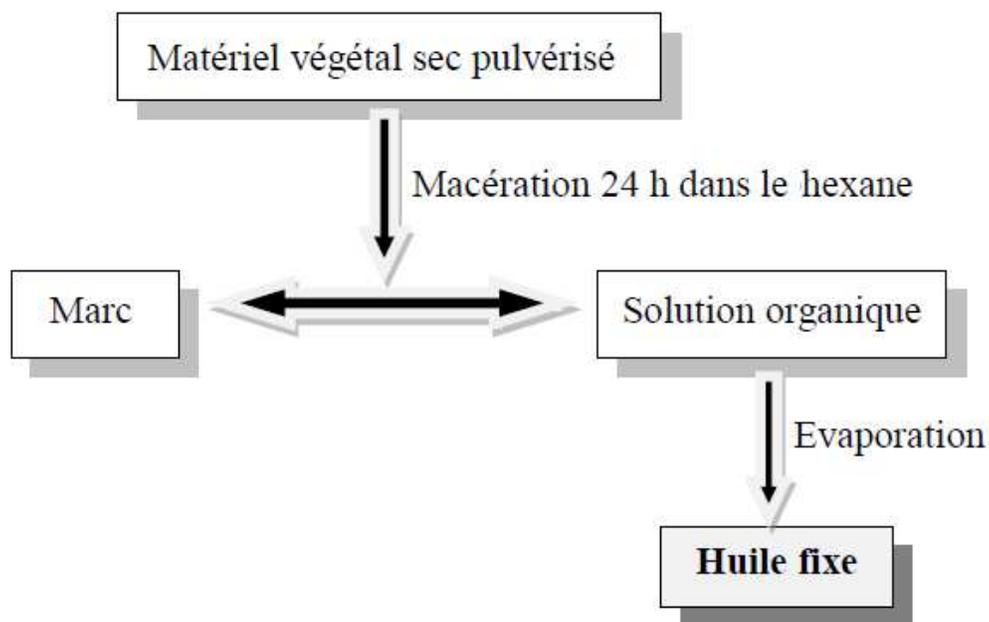


Figure 37: Extraction des huiles fixes.

➤ **Détermination du rendement**

Le rendement d'huile fixe obtenu (figure 38) est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la plante à traiter. Le rendement, exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante :

$$\mathbf{Rdt = (P_B / P_A) \times 100}$$

- **Rdt** : Rendement (%).
- **P_B** : Poids de l'huile en grammes.
- **P_A** : Poids de la matière végétale en grammes.



Figure 38: Huile issue des graines.

I.6.2. Préparation des FAME (*Fatty Acids Methyl Esters*) des huiles

➤ Trans-estérification

La méthode d'analyse des acides gras appelés encore triglycérides, repose sur la réaction de saponification de la fraction lipidique.

De par leur point d'ébullition trop élevé, les Acides Gras (AG) sont des composés non volatiles, alors ils ne peuvent pas être analysés directement par la GC.

Pour pallier cet inconvénient ils sont décomposés et dérivatisés en leurs esters méthyliques par la méthode FAME, ce qui les rend plus volatils.

Dans notre étude, les acides gras méthyles esters (FAME) sont préparés selon la méthode de Kuksis, A et al, [286] avec quelques modifications.

- **Principe**

Saponification des glycérides du corps gras, puis estérification des acides gras libérés en présence de tri-fluorure de bore.

- **Mode opératoire**

Introduire la prise d'essai dans un ballon approprié (+350mg). Ajouter 6 ml de la solution méthanoliques d'hydroxyde de sodium à 0.5 N et un régulateur d'ébullition. Adapter

le réfrigérant sur le ballon. Porter à l'ébullition à reflux jusqu'à disparition des gouttelettes de matière grasse (cette opération dure en général 5 à 10 minutes, mais dans certains cas exceptionnels peut demander plus de temps).

Dans le mélange maintenu à l'ébullition, ajouter 7 ml de la solution méthanolique de trifluorure de bore à 15 % par le haut du réfrigérant. Poursuivre l'ébullition pendant 2 minutes. Ajouter ensuite au mélange bouillant 5 ml d'hexane, et poursuivre l'ébullition pendant 1 minute.

Arrêter le chauffage puis débrancher le réfrigérant. Ajouter un peu de solution saturée de chlorure de sodium et agiter doucement le ballon plusieurs fois par rotation. Continuer à ajouter de la solution saturée de chlorure de sodium pour amener la hauteur du liquide au niveau du col du ballon.

Laisser décanter et transférer environ 1 ml de la couche supérieure (solution hexanoïque) dans un tube à essai et ajouter du sulfate de sodium anhydre pour éliminer les traces d'eau. La solution est prête pour être injecté directement à la GC-MS.

L'essai a été répété 3 fois.

I.6.3. Paramètres physico-chimiques de l'huile extraite

Les méthodes utilisées pour déterminer ces paramètres sont des méthodes classiques AOCS méthodes (American Oil Chemists Society).

1. Indice d'acide

La qualité d'une huile est définie par sa quantité en acides gras libres, plus cette quantité est faible, plus la qualité de l'huile est importante.

La mesure de l'indice d'acide permet de déterminer cette quantité d'acides gras libres présents dans une huile.

Cet indice correspond à le nombre de mg d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire pour neutraliser les acides gras libres (AGL) contenus dans 1 g de matière grasse.

Un excès connu de potasse alcoolique est ajouté à une solution de corps gras :



La potasse en excès est alors dosée en retour par une solution d'acide chlorhydrique.

- **Mode opératoire**

Peser dans un ballon ou un erlenmeyer 0,4 g de l'huile. Ajouter 20 ml d'alcool (EtOH) préalablement neutralisé, on le fait tiédir légèrement en le trempant dans un bain-marie, puis ajouter 10ml de solution de potasse alcoolique à 0,2 mol/l et 2 gouttes d'indicateur coloré. Enfin, on le titre avec l'acide chlorhydrique à 0,2 mol/l jusqu'à décoloration.

Un témoin doit être réalisé dans les mêmes conditions avec 20 ml d'éthanol et 10 ml d'une solution de potasse alcoolique à 0,2 mol/l, on ajoute 2 gouttes de phénolphthaléine et on le titre avec l'acide chlorhydrique 0,2 mol/l jusqu'à décoloration.

L'indice d'acide est donné par la formule suivante :

$$I_a = (V' - V) \times C \times 56.1 / m.$$

I_a : Indice d'acide

V' : Volume en millilitres de l'acide chlorhydrique pour le témoin.

V : Volume en millilitres de l'acide chlorhydrique utilisé pour l'essai.

C : Concentration d'acide chlorhydrique.

m : Masse en grammes de la prise d'essai.

2. Indice de saponification

L'indice de saponification correspond à la masse de potasse (KOH) en mg nécessaire pour neutraliser les acides gras libres et pour saponifier les acides gras combinés dans un gramme de corps gras.

- **Mode opératoire**

Dans un ballon, on introduit : une masse de 0,4g d'huile, on ajout 20 ml d'éthanol, et 20 ml de potasse alcoolique 0,2 mol/l. On porte à ébullition au bain-marie pendant 40 min en agitant fréquemment et en veillant à ce que les vapeurs se condensent dans la partie inférieure du réfrigérant. On laisse refroidir le ballon puis on dose le contenu par l'acide chlorhydrique 0,2 mol/l en présence de la phénolphaléine. On réalise dans les mêmes conditions un témoin. Enfin, on détermine l'indice de saponification selon la formule suivante :

$$I_s = \frac{(V' - V) \times C \times 56,1}{m}$$

I_s : l'indice de saponification.

V' , V , C , N et m sont définis préalablement.

3. Indice d'iode

L'indice d'iode d'un lipide est la masse de diiode (I_2) (exprimée en mg) capable de se fixer sur les insaturations des acides gras de 1g de matière grasse.

La méthode de Wijs nous permet de déterminer le degré d'insaturations d'un corps gras.

- **Mode opératoire :**

Dans l'erlenmeyer, on introduit 0,2g de corps gras, 20ml de chloroforme et 20ml de réactif de Wijs (0.1M), on ferme la fiole et on agite énergiquement puis on la laisse reposer durant 45 min à l'abri de lumière.

On ajoute ensuite 100ml de l'eau distillé, 20ml de solution d'iodure de potassium KI (10%). On bouche et on agite vigoureusement pendant 5 minutes ; Puis on titre avec la solution standard de thiosulfate de sodium (0,1 M), jusqu'à ce que la coloration jaune ne soit presque plus visible. On ajoute quelques gouttes de la solution d'amidon (1%) et on poursuit le titrage sous agitation intense jusqu'à disparition de la coloration bleue.

On réalise dans les mêmes conditions un témoin en utilisant les mêmes réactifs mais sans corps gras. L'indice d'iode en mg d'iode absorbé est :

$$I_i = \frac{(V' - V) \times C \times 12,69}{m}$$

I_i : Indice d'iode.

V' : Volume en millilitre de thiosulfate de sodium pour titrer le témoin.

V : Volume de thiosulfate de sodium en ml pour titrer l'essai. .

C : Concentration exacte de la solution thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).

m : Masse en grammes de la prise d'essai

I.7. Etude des activités anti-oxydantes

I.7.1. DPPH test

A. Macération

1g de matière sèche est extrait avec 20 ml de (MeOH/H₂O ; 7:3; V/V) pendant 24 heures dans l'obscurité. Le filtrat obtenu est utilisé pour l'analyse.

B. Principe

Le DPPH (1,1-diphényl-2-picryl-hydrayl), un radical libre de couleur violette, est réduit en présence de composés anti-radicalaires [287].

Le test DPPH consiste en la réduction d'une solution alcoolique de l'espèce radicalaire DPPH[•] en présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène (AH), qui aboutit à la formation d'une forme non radicalaire DPPH-H. cette réduction se traduit par un changement de couleur de la solution qui vire du violet au jaune. La réaction est alors quantifiée en mesurant l'absorbance de la solution par spectrophotométrie à 517 nm.

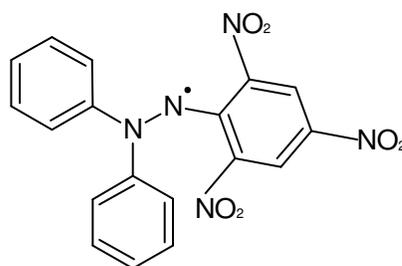


Figure 39: Structure chimique du radical libre DPPH[•] (2,2 DiPhenyle-1-Picryl-Hydrazyle).

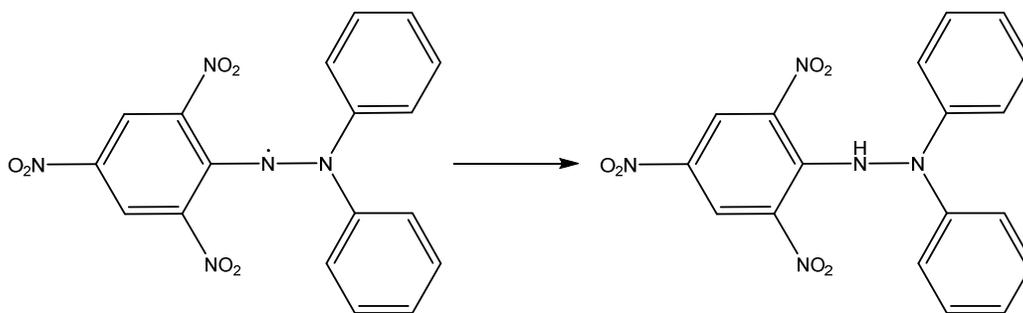


Figure 40: Mécanisme d'action de DPPH

C. Mode opératoire

Le test (DPPH) est réalisé par la méthode décrite par Kim et al [283] avec quelques modifications.

D'abord, une solution méthanolique de DPPH à 0,004% (P/V) (100 µM) dans du méthanol-eau (7 : 3) a été préparée à chaque fois et maintenue dans l'obscurité.

A 2,90 ml de la solution de méthanol (100 µM DPPH) est ajouté 100 µl de l'extrait à étudier. La solution est mélangée puis incubée à 37 C° pendant 30 minutes à l'abri de la lumière. L'acide ascorbique (vitamine C) est utilisé comme étalon. La solution radicalaire est préparée fraîchement.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en projetant l'absorbance en fonction des différentes concentrations de vitamine C. L'absorbance est mesurée à 517 nm contre un blanc formé de 2,90 ml de la solution méthanolique de DPPH (100 µM) et 100 µl de méthanol.

Ensuite le pourcentage d'inhibition sera calculé à partir de la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = \left(\frac{\text{Abs blanc} - \text{Abs échantillon}}{\text{Abs blanc}} \right) \times 100$$

Les échantillons à étudier et le témoin sont préparés dans les mêmes conditions opératoires et toutes les opérations sont réalisées en triplicata.

La mesure de la décroissance de la coloration violette au cours du temps permettra de déterminer l'IC50 qui correspond au temps au bout duquel 50% de coloration est perdue.

Une autre mode d'expression du résultat consiste à construire une gamme d'étalon avec la vitamine C puis de reporter l'absorbance des échantillons sur la courbe d'étalonnage. Cela permet d'exprimer le résultat en g d'équivalent de vitamine C par 100 gramme de matière sèche (gEVC/100g MS).

I.7.2. ABTS test

A. Préparation des extraits

0,1 g de poudre ont été introduites dans un pilulier contenant 20 ml d'un mélange méthanol/eau (70/30) (V/V) et ont été macérées durant toute une nuit dans l'obscurité. Le filtrat obtenu est utilisé pour l'analyse.

B. Principe

Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à réduire le radical cationique $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (sel d'ammonium de l'acide 2, 2'- azino bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) en solution qui donne une couleur bleu-vert.

Au cours de ce test le sel d'ABTS perd un électron pour former un radical cation ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) de couleur sombre en solution. La réaction se déroule en deux étapes : au cours de la première étape le radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ est formé par arrachement d'un électron à un atome d'azote de l'ABTS. La deuxième se déroule en présence de vitamine C (ou d'antioxydant donneur de H^{\bullet}), le radical d'azote concerné piège un H^{\bullet} , conduisant à l' ABTS^+ , ce qui entraîne la décoloration de la solution.

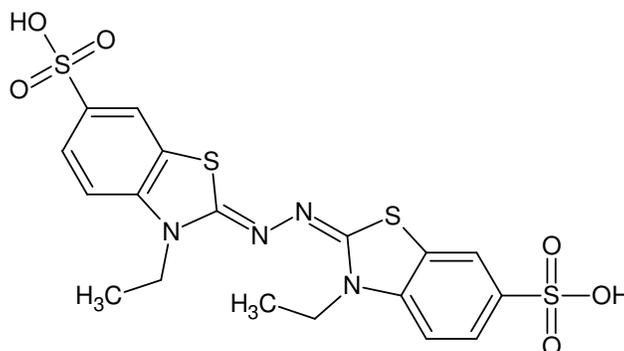


Figure 41: Acide 2,2'-azino-bis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS).

C. Mode opératoire

La méthode utilisée est celle décrite par Roberta *et al.* [288] avec quelques modifications. Ainsi, Une solution de 7 mmol d'ABTS (Acide 2,2'-azino-bis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) réagit avec 2,45 mmol de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, Le mélange des deux solutions est incubé à température ambiante pendant 12 à 16 heures dans l'obscurité pour avoir une couleur sombre contenant les radicaux ABTS^{\bullet} .

L'absorbance est mesurée à une longueur d'onde maximale de 734 nm. L'absorbance de la solution mère obtenue est réglée avec du méthanol jusqu'à avoir une absorbance finale de $0,7 \pm 0,02$.

L'extrait de plante (0,1ml) est ajouté à 4,9 ml de la solution radicalaire d'ABTS. Le mélange est incubé à 37 °C dans un bain-marie à l'abri de la lumière pendant 20 mn à 37°C. Un contrôle constitué de 0,1ml de méthanol et de 4,9 ml de la solution d'ABTS est lu avec chaque série d'extrait à 734 nm.

Une droite d'étalonnage est établie avec des solutions d'acide ascorbique (vitamine C) préparées à différentes concentrations.

I.7.3. PPM test

Le test du PPM (PhosPhoMolybdate) permet non seulement de quantifier l'apport de l'activité antioxydante des polyphénols mais aussi d'autres composés antioxydants tel que les vitamines (C, E...) [289].

A. Préparation des extraits

1g de matière sèche est extrait avec 20 ml de (MeOH/H₂O ; 7:3; V/V) pendant 24 heures dans l'obscurité. Le filtrat obtenu est utilisé pour l'analyse.

B. Principe

Le test est basé sur la réduction du molybdène de l'état d'oxydation (VI) à l'état d'oxydation (V). Cette réduction se traduit par la formation d'un complexe verdâtre (phosphate/ Mo(VI)) à un pH acide. En présence d'antioxydant, on mesure la diminution de la coloration du complexe molybdène (VI) en présence d'antioxydant.

C. Mode opératoire

La méthode consiste à introduire 0,1 ml de l'extrait de plante avec 1 ml de la solution du réactif (0,6 M H_2SO_4 + 28 mM Na_2HPO_4 + 4 mM de molybdate d'ammonium) dans un tube Eppendorf.

Les tubes sont bien fermés avec du papier aluminium puis incubés à 95 °C pendant 1h30 min. Après les avoir refroidis à une température ambiante, l'absorbance est mesurée à 695 nm. Le témoin est constitué de 0,1 ml de méthanol mélangé avec 1 ml de réactif mentionné ci-dessus.

Une courbe d'étalonnage est réalisée à partir des absorbances en fonction des différentes concentrations de vitamine C, les résultats obtenus sont exprimés en g équivalent vitamine C par gramme de matière sèche (g VCE/100g MS).

La préparation des échantillons et du témoin est réalisée dans les mêmes conditions opératoires, et tous les tests sont reproduits au moins trois fois.

I.8. Etude de l'activité antimicrobienne

L'étude de l'activité antibactérienne *in vitro* a été réalisée au laboratoire de Biologie et Physiologie Animale de l'Université BADJI Mokhtar –Annaba.

I.8.1.Souches utilisées

Sept souches bactériennes ont été testées : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae* sp, *Salmonella enteritidis*, *Entérobacter* et *Candida albicans*.

I.8.2. Méthode utilisée

L'activité antimicrobienne des extraits a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé [290-292].

I.8.3. Stérilisation du matériel

Les tubes à essai utilisés dans la préparation des solutions bactériennes et les disques en papier Wattman (6 mm de diamètre) enrobés dans du papier aluminium ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes.

I.8.4. Préparation de l'inoculum bactérien

Chaque souche a été repiquée par la méthode des stries sur une gélose non inhibitrice (gélose nutritive) pour obtenir des colonies isolées et incubées à 37°C pendant 18 à 24 h, pour obtenir une culture jeune. Après incubation, on a choisi 4 à 5 colonies bien isolées avec une anse de platine et les transférer dans des tubes contenant de l'eau distillée stérile afin d'avoir des suspensions microbiennes ayant une turbidité voisine à celle de McFarland 0.5 ou à une DO de 0.08 à 0.10 à 625 nm. Cette comparaison est mesurée à l'aide d'un densitomètre.

I.8.5. Ensemencement et dépôt des disques

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîtes Pétri. Après l'ajustement de la turbidité de la suspension servant d'inoculum, on a trempé un écouvillon dans la

suspension bactérienne, puis l'essorer en pressant fermement sur la paroi interne du tube, et on a étalé la surface entière avec la gélose Mueller Hinton à trois reprises en tournant la boîte à environ 60°C après chaque application dont le but d'avoir une distribution égale de l'inoculum. Enfin, on a écouvillonné partout autour du bord de la surface de la gélose. L'écouvillon est rechargé à chaque fois qu'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri avec la même souche.

Des disques de papier Wathman stériles (6 mm de diamètre) stériles imprégnés de concentrations croissantes d'extraits repris avec le diméthyle sulfoxyde (DMSO) à raison de 10 µl par disque, ont été déposés délicatement à l'aide d'une pince stérile sur la surface de la gélose. Des témoins imbibés seulement par le DMSO ont été réalisés.

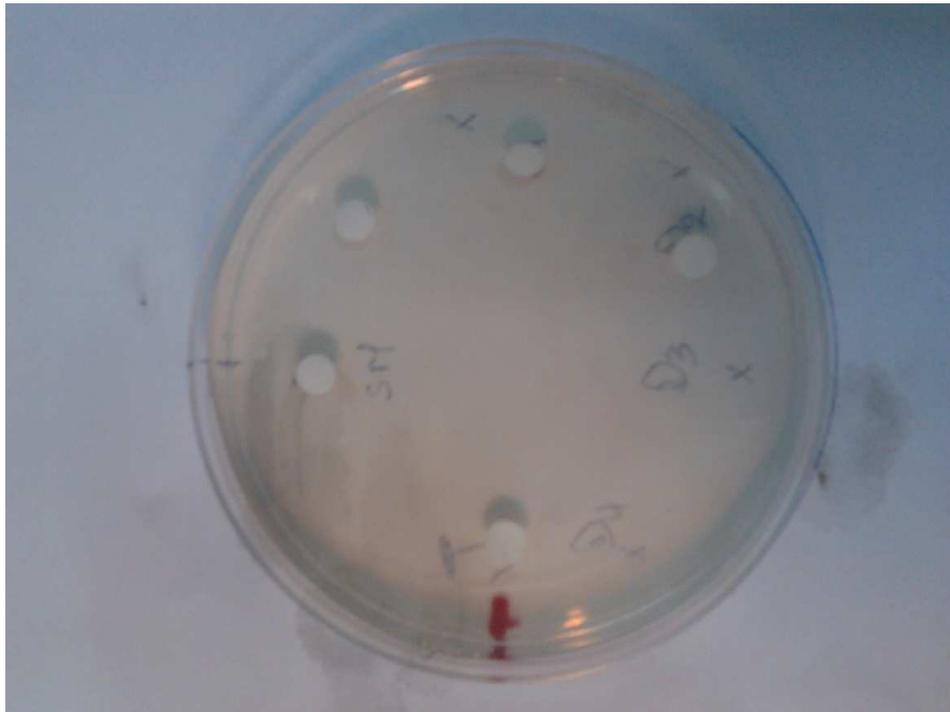


Figure 42: dépôt des disques dans la boîte de pétri

Incubation

Les bactéries ont été incubées 24 heures à 37°C par contre, les levures ont été incubées pendant 48h à 37°C.

I.8.6. Expression des résultats

L'activité antibactérienne a été faite en mesurant à l'aide d'une règle le diamètre de la zone d'inhibition, autour des disques.

- **Préparation de la gamme de concentration des extraits végétaux**

La gamme de concentration de l'extrait végétal a été préparée dans sept tubes à essais numérotés de 1 à 7 par la méthode de la double dilution selon une progression géométrique de raison 1/2.

- **Inoculation**

Dans une série de huit tubes à hémolyse numérotés de C1 à C8, on a introduit 1mL de l'inoculum pur. Ensuite, on a ajouté dans les tubes, 1ml d'extrait végétal selon la gamme de concentration préparée. Cette répartition d'extrait végétal a été faite de sorte que 1ml d'extrait végétal de 200 mg/ml soit transféré dans le tube C1, le tube C2 a reçu 1 ml de 100 mg/ml ainsi de suite jusqu'au tube C7 qui a reçu 1ml de la solution à 3,1 mg/ml. Le tube C8 a reçu en lieu et place de l'extrait végétal, 1 ml de BMH stérile qui a servi de témoin de croissance. Du fait de la dilution volume/volume ainsi réalisée, la concentration dans les tubes a été réduite de moitié. Ces tubes ont été incubés à 37 °C pendant 24 h.

- **Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)**

La CMI est la plus faible concentration de la substance pour laquelle il n'y a pas de croissance visible à l'œil nu après un temps d'incubation de 18 à 24 h. Sa détermination a été faite par observation du trouble induit par la croissance des germes étudiés dans chaque tube.

La CMI a été la plus petite concentration pour laquelle il n'y a pas eu de trouble observé à l'œil nu.

- **Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)**

La concentration minimale bactéricide (CMB) est la plus faible concentration de substance qui laisse au plus 0,01% de germes survivants. A l'aide d'une anse calibrée à 2 μ l, les contenus des tubes dans lesquels aucun trouble n'a été observé ont été prélevés et ensemencés sur une gélose Mueller-Hinton en commençant par le tube de la CMI.

L'ensemencement a été fait par stries parallèles de 5 cm de long à la surface de la gélose (boîte B). Après 24 h d'incubation à l'étuve à 37 °C, le nombre de colonies sur les stries a été comparé à celles de la boîte de numération de l'inoculum (boîte A). Ainsi, le premier tube expérimental dont le nombre de germes présents sur sa strie est inférieur ou égal à celui de la dilution correspondra à la CMB.

CHPITRE –II–

RÉSULTATS ET
DISCUSSION

II- RESULTATS ET DISCUSSION

II.1. Screening Phytochimique

Les Résultats des tests phytochimiques réalisés sur les différentes plantes sont récapitulés dans le tableau 3 :

Tableau 3: Screening phytochimique de la partie aérienne des espèces étudiées.

Espèce Groupes chimiques	<i>E. biumbellata</i>	<i>E. dendroides</i>	<i>E. terracina</i>
Alcaloïdes	-	-	-
Flavonoïdes	+++	+++	+++
Tannins	+++	+++	+++
Cardenolides	++	++	-
Sterols et terpènes	+++	++	++
Saponines	+	+	+
Lipides	++	++	+
Anthocyanes	-	-	++

+++ : forte abondant; ++ : présence; - : non détecté.

Les résultats du criblage phytochimique montrent une forte présence des tanins, des flavonoïdes et des terpènes et stérols et une présence, en quantité minime, des saponines dans les trois plantes étudiées. La présence des anthocyanes n'est observée que dans l'*Euphorbia terracina*.

On s'aperçoit aussi que les deux plantes *E. biumbellata* et *E. dendroides* sont riches en cardénolides à l'inverse de l'*E. terracina* (aucune trace détectée).

Notons enfin, l'absence totale des alcaloïdes de toute la partie aérienne des trois espèces d'*Euphorbia* étudiées.

II.2. Dosage des composés polyphénoliques totaux (PPT)

Une courbe d'étalonnage (figure 43) est établie en utilisant l'acide gallique comme référence et les résultats sont exprimés en g équivalent d'acide gallique par 100 grammes de matière végétale sèche (g EGA/ 100g Ms). Elle est obtenue avec un coefficient de corrélation de l'ordre de 0,998.

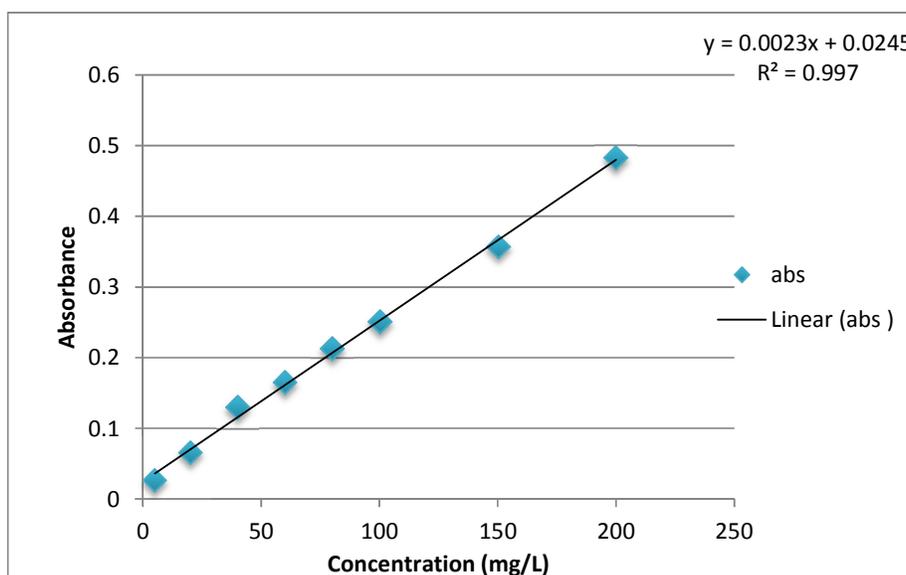


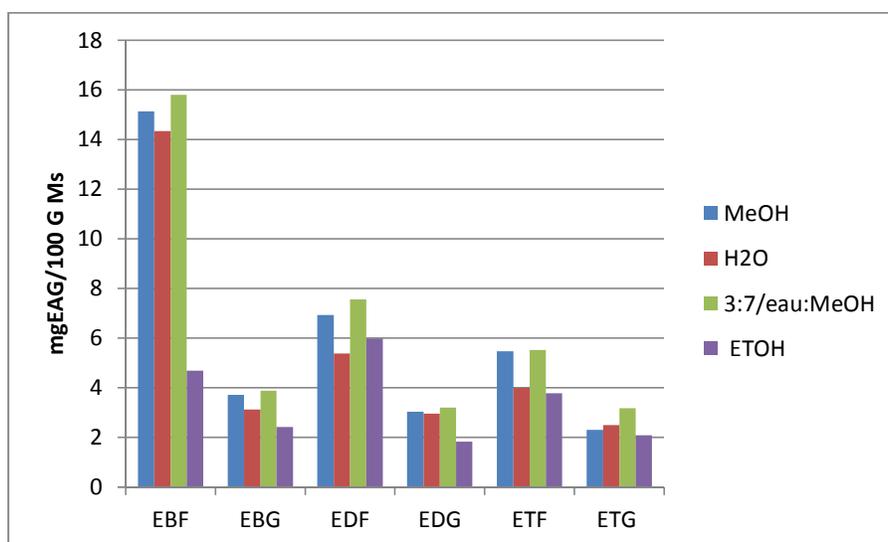
Figure 43: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Les résultats de l'analyse spectrophotométrique des composés phénoliques totaux sont résumés dans le tableau 4 et sont représentés par la figure 44 où la teneur est exprimée en grammes équivalents à l'acide gallique (g GAE / 100g Ms).

Tableau 4: Teneurs en polyphénols totaux des différents extraits (g EAG /100g Ms).

Plantes	MeOH	H ₂ O	MeOH / H ₂ O (7 / 3)	ETOH
EBF	15,13 ± 0,43	14,33 ± 0,39	15,79 ± 0,52	12,69 ± 0,35
EBG	3,71 ± 0,11	3,13 ± 0,15	3,88 ± 0,21	2,43 ± 0,08
EDF	6,93 ± 0,27	5,39 ± 0,30	7,55 ± 0,33	5,99 ± 0,32
EDG	3,03 ± 0,09	2,95 ± 0,12	3,21 ± 0,19	1,84 ± 0,06
ETF	5,47 ± 0,28	4,00 ± 0,28	5,52 ± 0,26	3,77 ± 0,29
ETG	2,30 ± 0,08	2,5 ± 0,09	3,18 ± 0,14	2,09 ± 0,12

EBF : *E. biumbellata* feuilles ; **EBG** : *E. biumbellata* graines ; **EDF** : *E. dendroides* feuilles ; **EDG** : *E. dendroides* graines ; **ETF** : *E. terracina* feuilles ; **ETG** : *E. terracina* graines.

**Figure 44:** Teneur en composés phénoliques totaux.

EBF : *E. biumbellata* feuilles ; **EBG** : *E. biumbellata* graines ; **EDF** : *E. dendroides* feuilles ; **EDG** : *E. dendroides* graines ; **ETF** : *E. terracina* feuilles ; **ETG** : *E. terracina* graines.

A partir de ces résultats, on s'aperçoit que la quantité de composés phénoliques totaux variée à travers les deux parties des trois genres étudiées :

Les extraits des feuilles de l'*Euphorbia biumbellata* donnent les teneurs les plus élevées en polyphénol totaux avec des valeurs comprises entre 15,79 et 12,69 g GAE/100g Ms.

L'examen de ces résultats, montrent aussi que l'extrait hydro-alcoolique (7/3 : MeOH/H₂O) présente la teneur la plus élevée en polyphénols et cela avec toutes les plantes tandis que les teneurs les plus faibles sont enregistrés avec les extraits éthanoliques.

II.3. Dosage des flavonoïdes totaux (FVT)

La quercétine est considérée comme composé de référence utilisé pour le dosage des flavonoïdes totaux. Une courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration en quercétine a été donc réalisée (figure 45) avec un R² de l'ordre de 0,99.

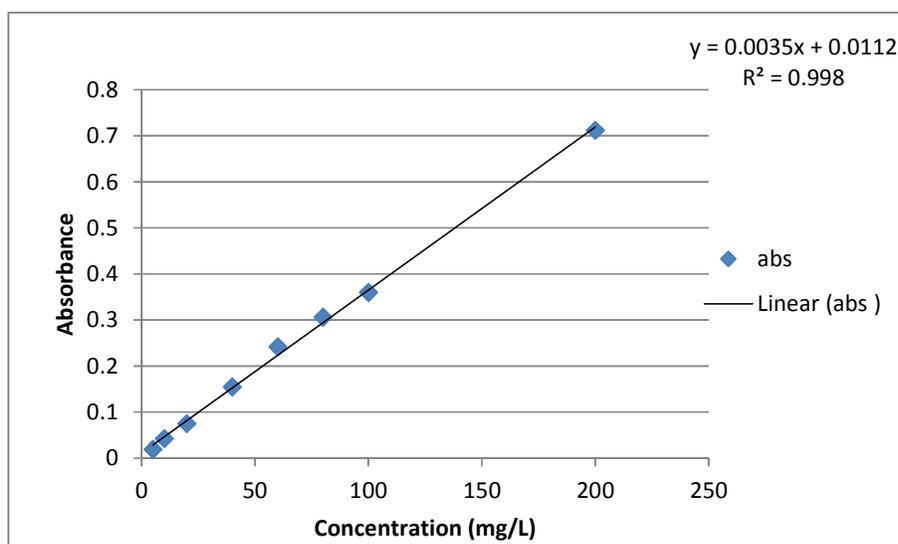


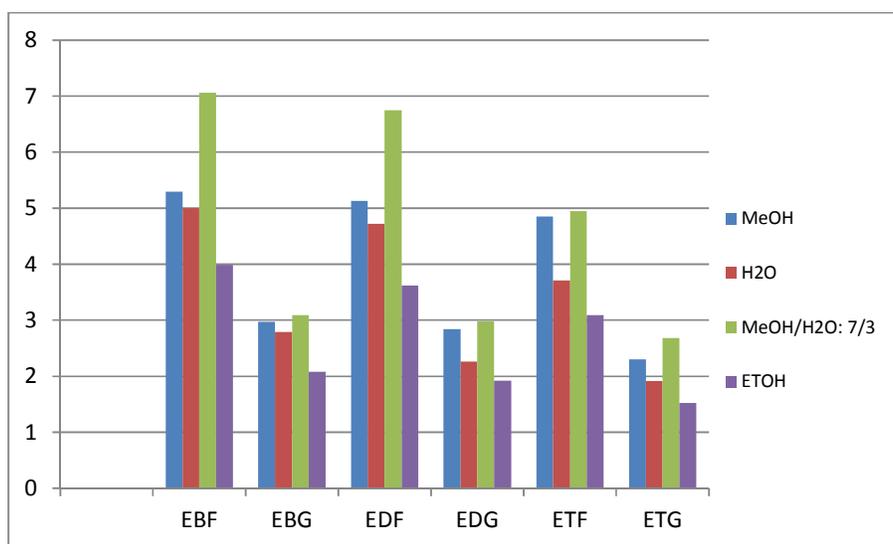
Figure 45: Courbe d'étalonnage de la quercétine.

Les résultats de l'analyse spectrophotométrique des flavonoïdes totaux sont résumés dans le tableau 5 et sont représentés par la figure 46 où les concentrations sont exprimées en g équivalent quercétine (QE) par 100 gramme de matière sèche (g EQ /100g Ms).

Tableau 5: Teneurs en flavonoïdes totaux des différents extraits (g QE/100g Ms)

Plantes	MeOH	H ₂ O	MeOH / H ₂ O (7 / 3)	ETOH
EBF	5,29 ± 0,22	5,00 ± 0,24	7,06 ± 0,36	3,99 ± 0,16
EBG	2,97 ± 0,09	2,79 ± 0,13	3,09 ± 0,12	2,08 ± 0,09
EDF	5,13 ± 0,23	4,72 ± 0,20	6,75 ± 0,32	3,62 ± 0,17
EDG	2,84 ± 0,11	2,26 ± 0,09	2,98 ± 0,10	1,92 ± 0,08
ETF	4,85 ± 0,18	3,71 ± 0,17	4,95 ± 0,21	3,09 ± 0,13
ETG	2,30 ± 0,11	1,91 ± 0,05	2,68 ± 0,11	1,52 ± 0,04

EBF : *E. biumbellata* feuilles ; **EBG** : *E. biumbellata* graines ; **EDF** : *E. dendroides* feuilles **EDG** : *E. dendroides* graines ; **ETF** : *E. terracina* feuilles ; **ETG** : *E. terracina* graines.

**Tableau 46:** Teneur en flavonoïdes totaux.

EBF : *E. biumbellata* feuilles ; **EBG** : *E. biumbellata* graines ; **EDF** : *E. dendroides* feuilles ; **EDG** : *E. dendroides* graines ; **ETF** : *E. terracina* feuilles ; **ETG** : *E. terracina* graines.

Comme on peut le voir, d'après ces résultats, les teneurs les plus élevées sont obtenues avec les extraits hydro-méthanoliques des feuilles de l'*Euphorbia biumbellata* suivie des feuilles de l'*Euphorbia dendroides* (7.06 et 6,75 g EQ/100g Ms, respectivement).

En examinant ces résultats, il ressort aussi que les feuilles des trois plantes sont toujours plus riches en flavonoïdes que les graines.

II.4. Dosage des tanins condensés (TC)

Une courbe d'étalonnage est établie en utilisant la catéchine comme référence (figure 47).

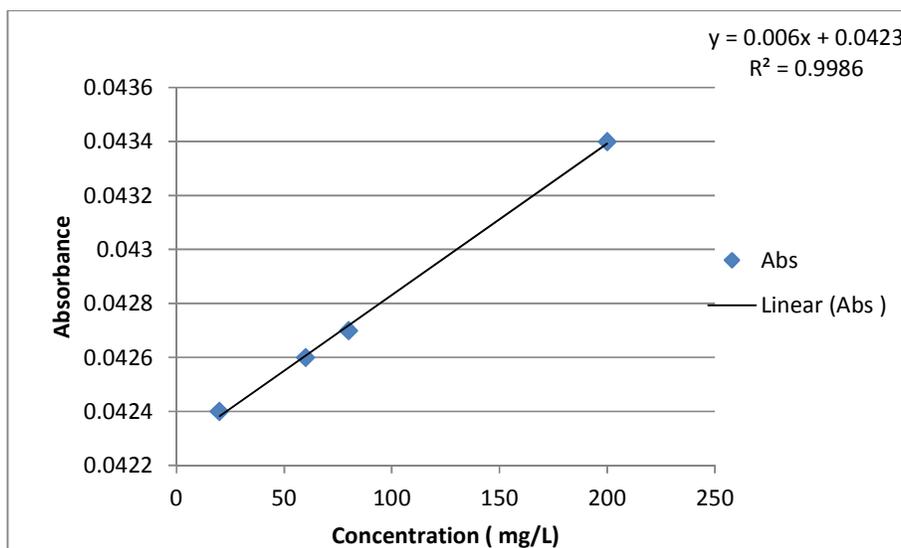


Figure 47 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des tanins totaux.

Les résultats d'analyse consignés dans le tableau 6 sont exprimés en g équivalent catéchine par 100 gramme de matière sèche (g EC/100 g Ms) :

Tableau 6 : Teneurs en tanins totaux des différents plantes.

Partie aérienne	EB	ED	ET
g CE/100g Ms	6.41 ± 0,13	7.31 ± 0,33	15.54 ± 0,56

EB : *Euphorbia biumbellata* ; **ED :** *Euphorbia dendroides* ; **ET :** *Euphorbia terracina*.

L'examen de ces résultats, montre que l'*Euphorbia terracina* est plus riche en tanins que les deux autres espèces : *Euphorbia dendroides* et *Euphorbia biumbellata*.

Sur l'ensemble des résultats obtenus, il ressort que la quantité en composés phénoliques totaux, en flavonoïdes totaux et en tanins, variées à travers les différents extraits et parties des trois espèces étudiées de l'*Euphorbia*. On remarque aussi que les feuilles sont toujours plus riches en composés polyphénoliques que les graines.

II.5. Analyses chromatographiques des extraits par LC-MS

Les figures 48 et 49 présentent les profils chromatographiques du mélange de standards enregistrées à deux longueurs d'ondes différentes : 280 et 360 nm. Sachant que les étalons sont préparés séparément dans des solutions méthanol-eau 50:50 (v/v) avec une concentration de 0.5 mg/ ml.

Le mélange de la solution injecté est composé de 10 étalons, à savoir : l'acide ascorbique, l'acide chlorogénique, l'acide gallique, la rutine, l'acide syringique, l'acide ellagique, l'acide furelique, la colchicine, la quercitine et l'acide cinnamique.

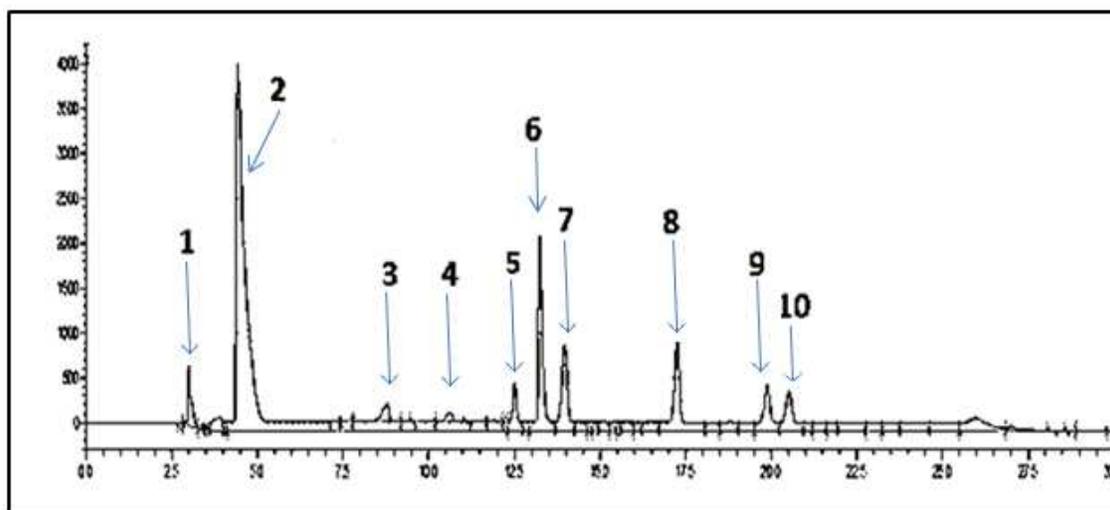


Figure 48: Profil chromatographique du mélange des étalons à 280 nm.

1: acide ascorbique; **2:** acide gallique; **3:** acide chlorogénique; **4:** acide syringique; **5:** rutine;
6: acide ellagique; **7:** acide furelique; **8:** colchicine; **9:** quercitine; **10:** acide cinnamique.

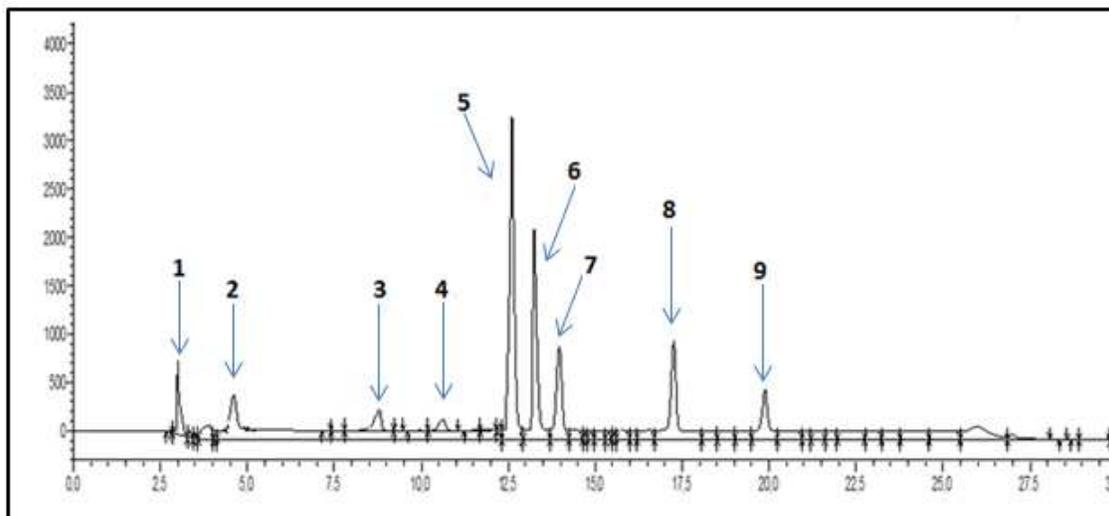


Figure 49: Profil chromatographique du mélange des étalons à 360 nm.

1: acide ascorbique; **2:** acide gallique; **3:** acide chlorogénique; **4:** acide syringique; **5:** rutine; **6:** acide ellagique; **7:** acide furelique; **8:** colchicine; **9:** quercitine; **10:** acide cinnamique.

L'identification des composés présents dans les extraits testés est réalisée par comparaison de leurs temps de rétention et des masses moléculaires des pics avec ceux des étalons.

Les valeurs du temps de rétention des standards sont regroupées dans le tableau 7 :

Tableau 7: Temps de rétention des standards.

Standards	Temps de rétention (min)
acide ascorbique	3
acide gallique	4,7
acide chlorogénique	8,7
acide syringique	10,55
Rutine	12,53
acide ellagique	13,35
acide furelique	13,85
Colchecine	17,3
Quercitine	19,9
acide cinnamique	20,7

Les profils chromatographiques des différents extraits de l'*Euphorbia* sont rapportés en annexes.

Nous regroupons dans le tableau suivant, les résultats d'analyses chromatographiques des différents extraits des trois espèces de l'*Euphorbia* étudiées.

Tableau 8: Tableau récapitulatif des résultats de l'analyse chromatographique.

Standards	<i>Euphorbia biumbelatta</i>		<i>Euphorbia dendroides</i>		<i>Euphorbia terracina</i>	
	Feuilles	graines	feuilles	graines	Feuilles	graines
Acide ascorbique	+	+	+	+	+	+
Acide gallique	+	+	-	+	-	+
Acide chlorogénique	+	+	+	+	+	+
Acide syringique	-	+	+	+	+	-
Rutine	+	+	-	-	+	+
Acide ellagique	+	+	+	+	+	+
Acide férulique	+	+	+	+	+	-
Colchicine	+	+	-	-	+	-
Quercitine	+	+	-	-	-	-
Acide cinnamique	-	-	-	-	-	-

Comme on peut le voir, l'acide ascorbique, l'acide chlorogénique et l'acide ellagique, sont les composés les plus représentatifs. Notons qu'on n'a pas pu identifier tous les composés par manque d'étalons adéquats.

De plus, on constate que l'acide gallique, l'acide syringique, la rutine et l'acide férulique sont des produits abondants dans nos extraits, tandis que la quercétine et la colchicine sont les moins détectés. D'autre part, on remarque l'absence totale de l'acide cinnamique des différents extraits étudiés.

On s'aperçoit aussi que l'*Euphorbia biumbelatta* est l'espèce qui renferme le plus de standards par rapport aux deux autres espèces.

II.6. Etude des huiles fixes

II.6.1 Rendements des extractions

Pour les analyses, l'huile est obtenue par macération à froid des graines dans l'hexane pendant 24 heures. Après séchage par le sulfate de sodium anhydre et évaporation du solvant sous pression réduite.

Les valeurs des rendements des extractions obtenus sont reportées dans le tableau 9.

Tableau 9: Rendement de l'huile fixe issue des trois plantes.

Huile fixe	Rdt (%)
<i>E. biumbelatta</i>	18.5
<i>E. dendroides</i>	20.05
<i>E. terracina</i>	17.48

II.6.2. Etude de la composition chimique des huiles fixes par GC-MS

Après transestérification, les huiles fixes des trois espèces de l'*Euphorbia* ont été analysées par GC-MS. Les résultats obtenus sont représentés par les chromatogrammes 60 à 62 ainsi que par les tableaux 10 à 12.

A. Huiles fixes de l'*E. biumbelatta* :

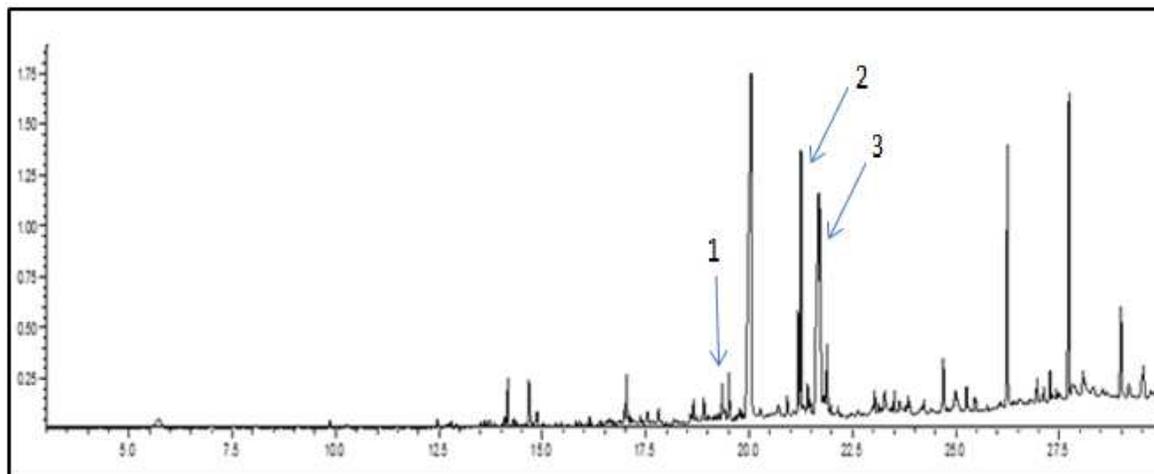
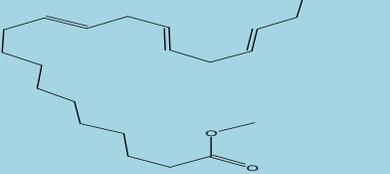
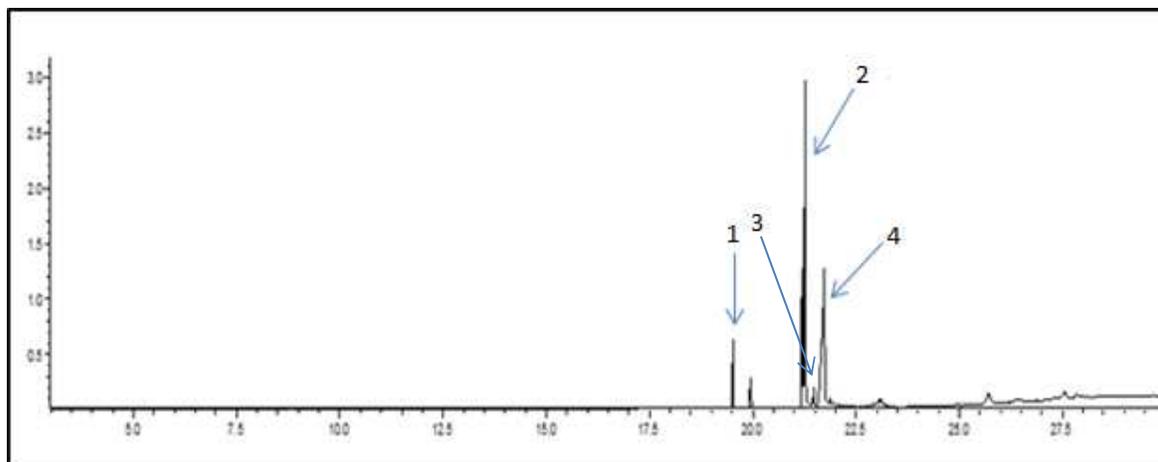


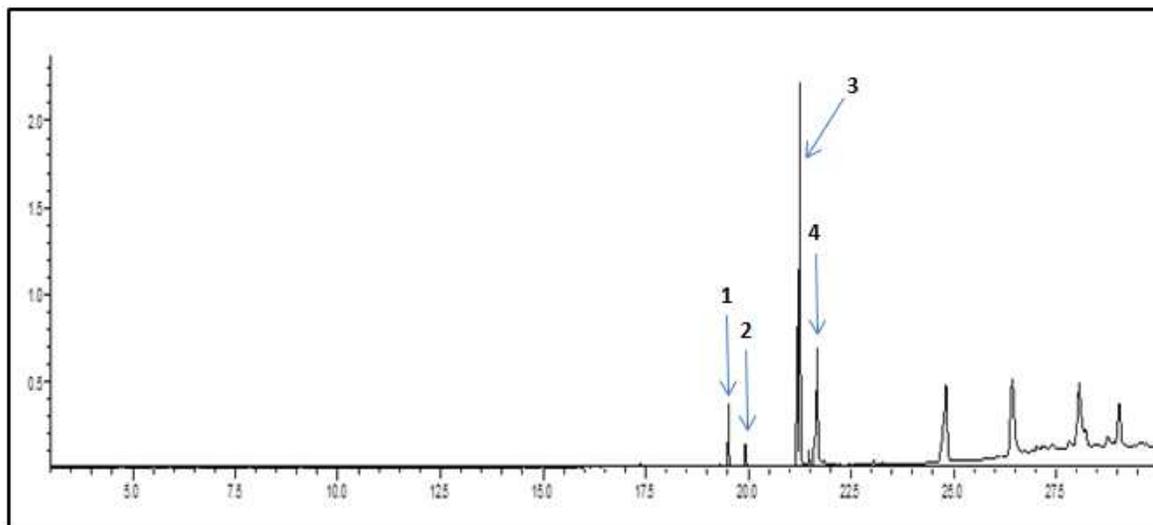
Figure 50: Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile des graines d'*Euphorbia biumbelatta*.

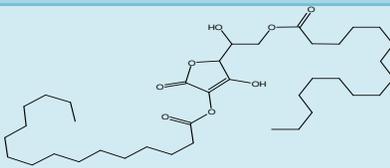
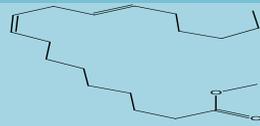
Tableau 10: Compositions chimiques d'huile des graines de l'*Euphorbia biumbelatta*.

N° :	Nom	Masse molaire	Temps de rétention (min)	Formule
01	Hexadecanoic acid, methyl ester	270	19.35	
02	8,11-Octadecadienoic acid, methyl ester	294	21.22	
03	11,14,17-Eicosatrienoic acid, methyl ester	320	21.64	

B. Huiles fixes de l'*E. dendroides*:**Figure 51:** Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile des graines d'*Euphorbia dendroides*.**Tableau 11:** Compositions chimiques d'huile des graines de l'*Euphorbia dendroides*.

N°:	Nom	Mass molaire	Temps de rétention (min)	Formule
01	Hexadecanoic acid, methyl ester	270	19.5	
02	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester (Linoleic acid, methyl ester)	294	21.19	
03	9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester ((Z,Z,Z)-linolenic acid methyl ester)	292	21.27	
04	Octadecanoic acid, methyl ester (Stearic acid methyl ester)	298	21.47	

C. Huiles fixes de l'*E. terracina* :Figure 52: Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile des graines d'*Euphorbia terracina*.Tableau 12: Compositions chimiques d'huile des graines de l'*Euphorbia terracina*.

N°:	Nom	Masse molaire	Temps de rétention (min)	Formule
01	Hexadecanoic acid, methyl ester	270	19.51	
02	1-(+)-Ascorbic acid 2,6-dihexadecanoate	652	19.92	
03	Linoleic acid, methyl ester	294	21.18	
04	11,14,17-Eicosatrienoic acid, methyl ester	320	21.86	

On peut remarquer que les profils GC-MS des trois plantes sont assez proches

Puisque les trois huiles analysées renferment les composés d'acides gras habituellement rencontrés dans les huiles végétales, à savoir l'acide hexadécanoïque, l'acide eicosatriénoïque et l'acide linoléique.

Ce n'est pas le cas pour le 1-(+)-ascorbic acid 2,6-dihexadecanoate, identifié dans l'huile fixe de l'*euphorbia terracina*. Sachant que ce composé, rarement trouvé, est très intéressant dans le domaine pharmaceutique.

II.6.3. Indices caractéristiques des différentes huiles

Nous représentons dans la figure suivante les valeurs déterminées des quelques indices caractéristiques des huiles fixes extraites des graines des trois espèces d'*Euphorbia* :

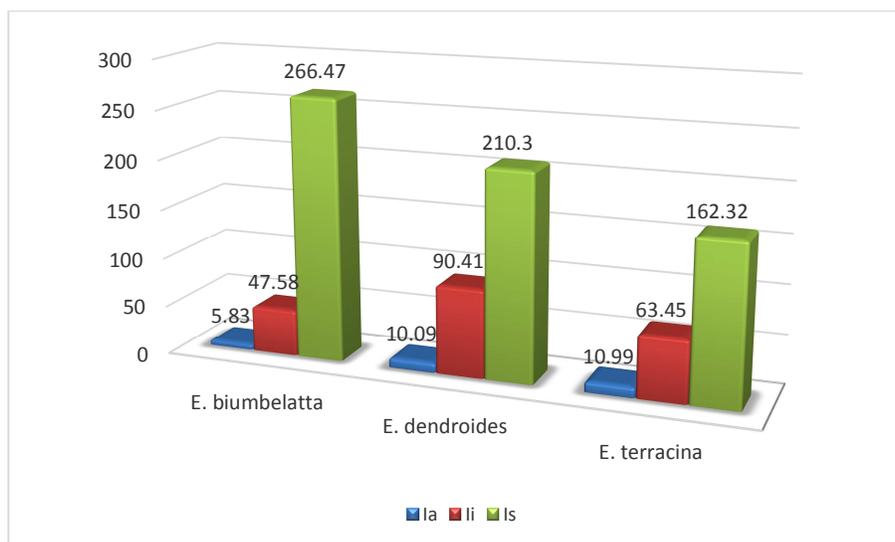


Figure 53: Caractéristiques physico-chimiques des huiles fixes des graines.

La mesure de l'indice d'acide permet de déterminer la quantité d'acides gras libres présents dans une huile. Une huile (comestible ou alimentaire) de bonne qualité doit présenter une acidité faible ou nulle. Cependant, aucun échantillon analysé ne présente une acidité nulle. Nous avons obtenus un indice d'acide moyennement grand (varie de 5,83 pour l'huile

des graines d'*euphorbia biumbelatta* à 10,99 pour l'huile des graines d'*euphorbia terracina*), cela veut dire qu'il y a un bon nombre d'acides gras libres dans les lipides.

Les valeurs de l'indice de saponification I_s , permettent de faire quelques estimations sur les masses moléculaires moyennes des acides gras et des triglycérides. Plus la masse molaire (MM) est élevée, plus l'indice de saponification est faible. Ceci rend compte que I_s varie inversement avec le MM des lipides.

La grande valeur de l'indice de saponification des trois huiles (182 à 266) indique que la masse moléculaire des acides gras de ces lipides n'est pas élevée.

La détermination de l'indice d'iode I_i permet de déterminer le degré d'insaturation global des huiles. En outre, il est possible d'établir une relation entre l'indice d'iode et la siccativité d'une huile :

- huiles non siccatives avec : $0 < I_i < 110$ comme l'huile d'olive ($I_i = 80-88$), l'huile d'arachide ($I_i = 90-98$).
- huiles semi-siccatives avec : $110 < I_i < 150$ comme l'huile de maïs ($I_i = 110-128$), l'huile de tournesol ($I_i = 120-136$).
- huiles siccatives avec : $I_i > 150$ comme l'huile de lin ($I_i = 180-190$), l'huile de chanvre ($I_i = 145-170$).

L'examen de nos résultats montre que les valeurs de l'indice d'iode obtenues pour nos trois échantillons sont faibles (elles varient entre 47,58 et 90,41), nos huiles sont donc des huiles non siccatives.

II.7. Etude de l'activité anti-oxydante

Les figures suivantes présentent les courbes d'étalonnage de la vitamine C réalisées pour les différents tests (DPPH, ABTS et PPM) :

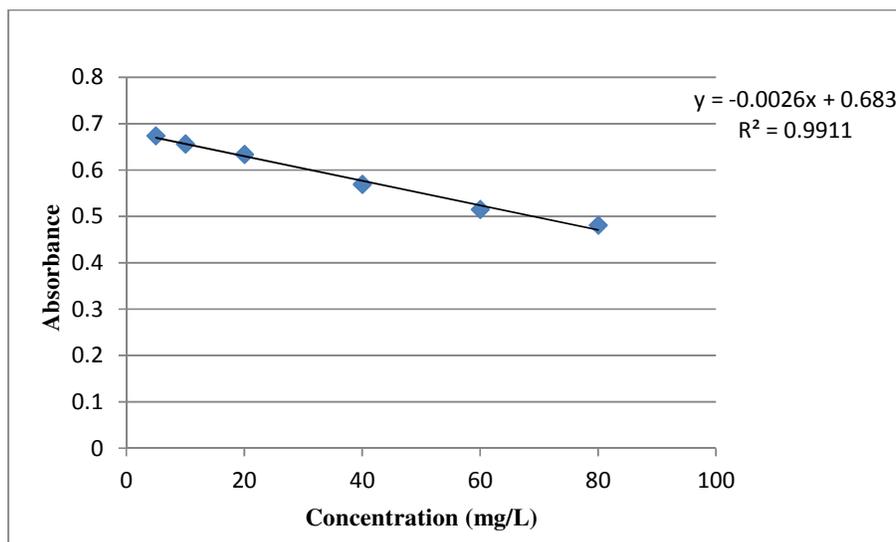


Figure 54: Courbe d'étalonnage de la vitamine C en utilisant le test DPPH.

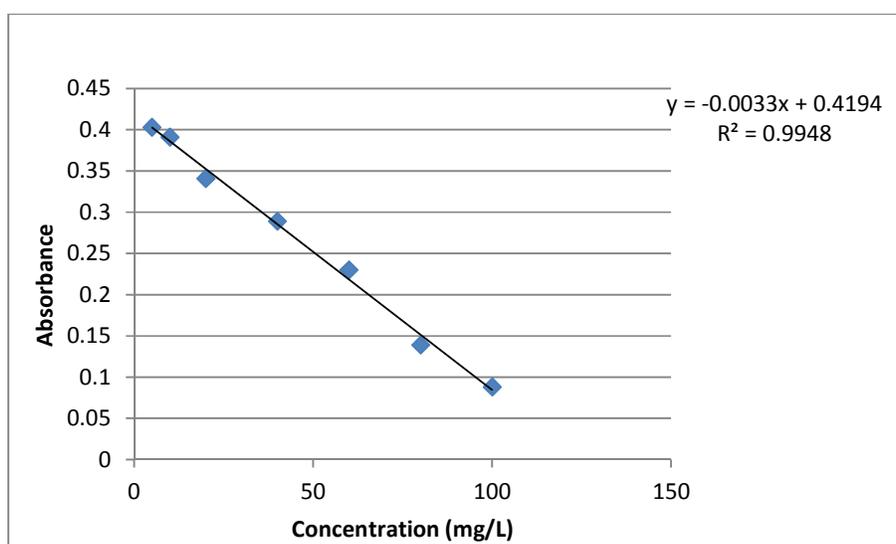


Figure 55: Courbe d'étalonnage de la vitamine C en utilisant le test ABTS.

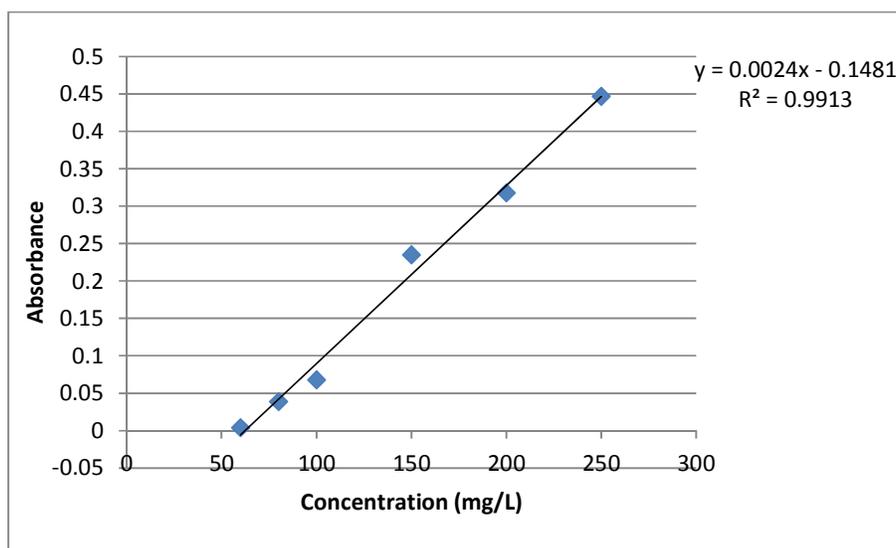


Figure 56: Courbe d'étalonnage de la vitamine C en utilisant le test PPM.

Sur la base des valeurs d'absorbance des solutions d'extrait ayant réagi, et comparées à la solution étalon en vitamine C, on peut déterminer l'activité antioxydante des trois plantes (tableau 13 et figure 57). Sachant que l'activité antioxydante est exprimée en gramme équivalents à la vitamine C (g VCE). Ces résultats se rapportent à 100 gramme de matière sèche et les valeurs représentent les moyennes de trois mesures \pm déviation standard.

Tableau 13: Résultats de l'activité antioxydante (EVC g/100g Ms).

Test	EB	ED	ET
DPPH	1,065 \pm 0,008	1,044 \pm 0,025	0,728 \pm 0,034
ABTS	1,403 \pm 0,008	0,725 \pm 0,017	0,640 \pm 0,043
PPM	0,905 \pm 0,017	0,817 \pm 0,025	0,875 \pm 0,066

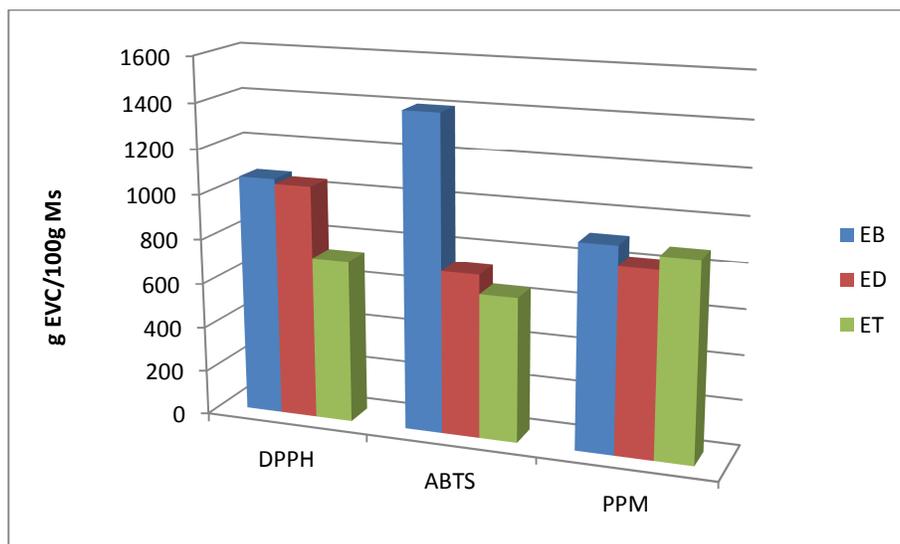


Figure 57: Capacité antioxydante exprimée en vitamine C selon les tests d'ABTS, DPPH et de PPM.

A partir de ces résultats, on s'aperçoit que tous les extraits des différentes plantes, exhibent une activité antioxydante remarquable. La plus grande valeur est observée avec l'extrait méthanolique de la partie aérienne de l'*euphorbia biumbelatta* en utilisant le test d'ABTS (1403 mg/100g de matière sèche).

Sur l'ensemble des résultats, on constate aussi que l'*euphorbia biumbelatta* présente les plus grandes valeurs d'activité antioxydante par rapport aux deux autres espèces.

Ces résultats sont confirmés par les valeurs du pourcentage d'inhibition et du IC_{50} déterminées pour le test DPPH (tableau 14).

Tableau 14: Valeur de PI et IC_{50} de l'activité antioxydante pour le test DPPH.

	<i>E. biumbelatta</i>	<i>E. dendroides</i>	<i>E. terracina</i>
PI (%)	77.57	69.27	57.6
IC_{50} (mg/ml)	49	64	84

Comme on peut le voir, l'extrait méthanolique de l'*euphorbia biumbelatta* donne une activité antioxydante élevée ce qui s'est manifesté par la faible valeur de son IC_{50} (49 mg/ml) et par la grande valeur de son pourcentage d'inhibition PI (77.57%).

Cela est dû certainement aux teneurs élevées en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux déterminées antérieurement par colorimétrie.

II.8. Etude de l'activité antimicrobienne

Au cours de cette étude, nous avons testé l'action des extraits méthanolique de trois espèces de *Euphorbia* vis-à-vis de sept souches bactériennes et fongique.

Les bactéries seront classées dans l'une des catégories : résistance, sensibilité limitée, sensibilité moyenne, très sensible, selon leur diamètre d'inhibition (tableau 58)

Tableau 15: Sensibilité et degré d'activité selon le diamètre d'inhibition [293].

Diamètre d'inhibition	Inférieur à 8 mm	De 8 à 14 mm	De 14 à 20 mm	Supérieur ou égale à 20 mm
Sensibilité du germe	Résistante	Sensibilité limitée	Sensibilité moyenne	Très sensible
Degré d'activité	(-)	(+)	(++)	(+++)

Tous les résultats de l'activité antibactérienne sont condensés dans le tableau 16 :

Tableau 16: Résultats de l'activité antibactérienne in vitro des extraits méthanolique en utilisant la méthode de diffusion du disque.

Extrait de la partie aérienne (mg/ml)		Diamètre d'inhibition en mm						
		Gram -					Gram -	Levure
		<i>Escherich ia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomon as aeruginosa</i>	<i>Salmonell a enteritidis</i>	<i>Entérobact er</i>	<i>Staphylococ cus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>E. biumbelatta</i>	200	19	16	14	20	14	22	18
	100	15	13	14	17	12	20	16
	50	11	12	11	16	11	18	11
	25	9	10	10	13	9	15	10
<i>E. dendroides</i>	200	15	19	12	20	15	23	16
	100	15	16	11	15	12	21	13
	50	12	12	8	15	10	19	10
	25	10	11	8	12	10	18	10
<i>E. terracina</i>	200	14	18	15	16	12	21	19
	100	13	17	13	13	12	18	16
	50	11	13	12	10	10	14	14
	25	7	11	10	10	8	10	10

En examinant ces résultats, il ressort que, même pour la plus faible concentration à savoir 25 mg/ml, tous les extraits sont révélés actifs envers tous les micro-organismes testés mais avec des degrés de sensibilité différents (figure 58).

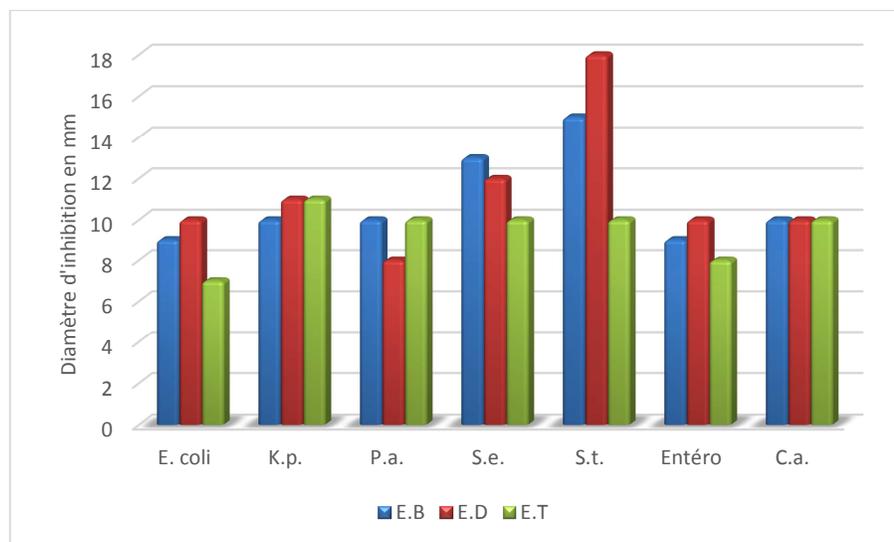


Figure 58: Diamètre de la zone d'inhibition des extraits méthanoliques des trois plantes pour la concentration de 25 mg/ml.

De plus, on s'aperçoit que pour la deuxième concentration (50 mg/ml), tous les micro-organismes testés présentent des sensibilités limitées et des sensibilités moyennes avec des zones d'inhibition comprises entre 10 et 18 mm à l'exception de l'extrait méthanolique de *E. dendroides*, qui présente une activité inhibitrice très faible pour la *Pseudomonas aeruginosa* avec une zone d'inhibition égale à 8 mm.

Pour des concentrations plus élevées (100 et 200 mg/ml), la sensibilité des bactéries augmente et devient même très sensible pour *Staphylococcus aureus* et *Salmonella enteritidis* (zone d'inhibition supérieure à 20 mm) comme le montre la figure suivante :

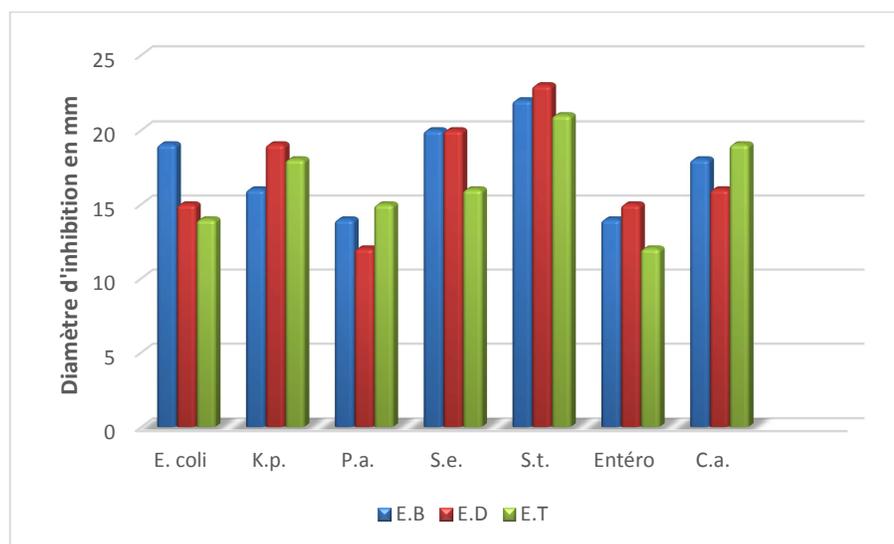


Figure 59: Diamètre de la zone d'inhibition des extraits méthanoliques des trois plantes pour la concentration de 200 mg/ml.

Globalement, le *Candida albicans*, qui est la seule levure testée, présente une sensibilité modérée vis à vis des trois extraits (diamètre d'inhibition varie entre 10 et 19 mm).

Sur l'ensemble des résultats obtenus, la souche *Staphylococcus aureus* apparaisse la souche la plus sensible. A l'inverse, la souche *Entérobacter* semble la souche la plus résistante. Cela est probablement dû à la différence de la structure de la paroi cellulaire entre les bactéries gram (-) et les bactéries gram (+). En effet, Les bactéries Gram (-), indépendamment de la membrane des cellules, possèdent une couche additionnelle : la membrane externe, qui se compose des phospholipides, des protéines et des lipopolysaccharides, cette membrane est imperméable à la plupart des molécules.

Quelques observations sont illustrées par les figures suivantes 60 et 61.

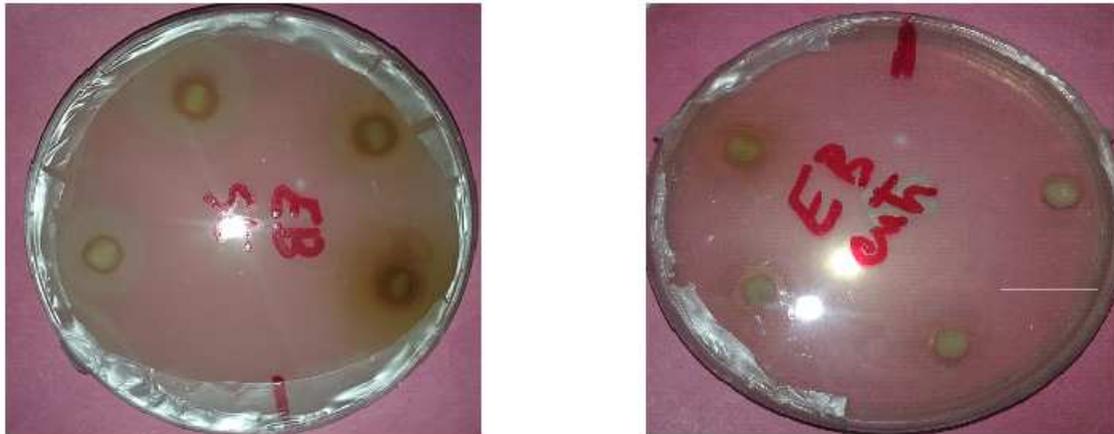


Figure 60: Effet inhibiteur de l'extrait de l'*E. biumbelatta* sur *Staphylococcus epidermidis* et *Entérobactère*.

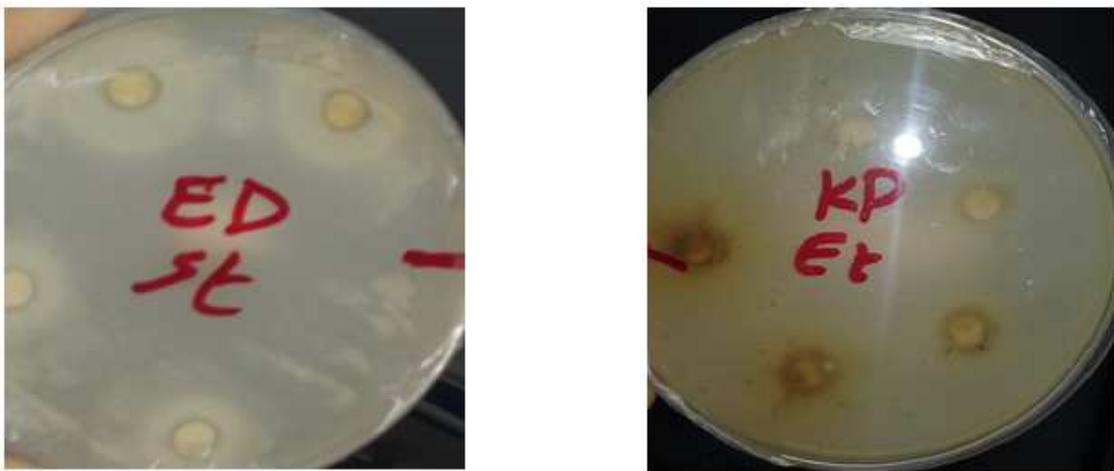


Figure 61: Effet inhibiteur de l'extrait de l'*E. dendroides* sur *Staphylococcus epidermidis* et *Klebsiella pneumoniae*.

Nous avons également déterminé La CMI pour la souche la plus sensible à savoir le *Staphylococcus aureus*. L'extrait méthanolique de l'*euphorbia biumbelatta* a montré un pouvoir antibactérien élevé avec une CMI de l'ordre de 100 mg/ml. Les deux autres extraits (*euphorbia dendroides* et *euphorbia terracina*) semblent moins actifs avec des CMI qui sont supérieures ou égales à 200 mg/ml. Cela concorde bien avec les résultats de l'activité antioxydante déterminés antérieurement.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse réalisé au *Laboratoire de Synthèse et Biocatalyse Organique*, a été mené dans le cadre de la valorisation des substances naturelles de la flore Algérienne. L'objectif principal a porté sur l'étude phytochimique de trois espèces de la famille des euphorbiacées à savoir : *Euphorbia biumbelatta*, *Euphorbia dendroides* et *Euphorbia terracina*. Sachant que l'étude bibliographique réalisée a montré que l'on ne disposait que de peu d'informations de nature chimique ou biologique sur ces espèces. Nous avons donc cherché quelques propriétés pharmacologiques et identifier quelques composés chimiques ou métabolites secondaires présents dans la partie aérienne (feuilles et graines) de ces plantes.

Dans une première partie, le screening phytochimique effectué, nous a permis de mettre en évidence que :

- ces plantes sont riches en tanins, flavonoïdes, terpènes et stérols.
- elles sont dépourvues d'alcaloïdes.
- les anthocyanes ne sont présents que dans l'*euphorbia terracina*.

En outre, les résultats de la quantification par des méthodes spectrophotométriques des polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et tannins condensés ont révélé que :

- l'extrait hydro-alcoolique (7/3 : MeOH/H₂O) des feuilles de l'*euphorbia biumbelatta* présente les teneurs les plus élevées en polyphénols totaux (valeurs comprises entre 15,79 et 12,69 g GAE/100g Ms) et en flavonoïdes totaux (valeurs comprises entre 7,06 et 3,99 g QE/100g Ms) tandis que les teneurs les plus faibles sont enregistrés avec les extraits éthanoliques.
- l'*euphorbia terracina* est plus riche en tanins que les deux autres espèces.

- les feuilles sont toujours plus riches en composés polyphénoliques que les graines.

Dans une deuxième partie, l'évaluation de la capacité antioxydante a été déterminée en utilisant trois tests différents (ABTS, DPPH et PPM). Les résultats montrent que toutes ces plantes manifestent une activité importante, et en particulier les extraits de l'*euphorbia biumbelatta*. De plus, une corrélation positive entre l'activité antioxydante et la teneur en composés poly-phénoliques a été établie.

Par ailleurs, les résultats obtenus pour la mesure de l'activité antimicrobienne, en utilisant la méthode de diffusion du disque, indiquent que tous les extraits méthanoliques manifestent une activité contre tous les micro-organismes testés. Les souches *staphylococcus aureus* et *Salmonella enteritidis* semblent être les plus sensibles avec des zones d'inhibition supérieures à 20 mm pour les concentrations élevées. De plus l'extrait méthanolique de l'*euphorbia biumbelatta* a montré un pouvoir antibactérien élevé avec une CMI de l'ordre de 100 mg/ml.

Cette étude confirme bien la concordance entre l'activité antimicrobienne et l'activité antioxydante d'un côté et le contenu en polyphénols des extraits méthanoliques d'un autre côté.

Dans une dernière partie, l'analyse de la composition chimique des extraits par LC MS a permis de faire plusieurs constatations :

- l'acide ascorbique, l'acide chlorogénique et l'acide ellagique, sont les composés les plus représentatifs.
- la quercétine et la colchicine sont les composés les moins détectés.
- absence totale de l'acide cinnamique
- l'espèce qui renferme le plus de standards est l'*euphorbia biumbelatta*.

Sachant que par manque d'étalons, on n'a pas pu identifier tous les composés.

En outre, l'étude de la composition chimique des huiles fixes des graines par CG-MS a montré que les huiles des trois espèces sont formées essentiellement d'acide hexadécanoïque, acide eicosatriénoïque et acide linoléique. L'huile fixe de l'*euphorbia terracina* contient également un composé rare qui est le 1-(+) acide ascorbique 2,6-dihexadecanoate, utilisé dans le domaine pharmaceutique.

Sur l'ensemble des résultats obtenus, on pourrait conclure que ces plantes peuvent être des sources naturelles de composés antioxydants et antimicrobiens d'importance élevée.

Pour la suite, Il est souhaitable de mener une étude plus approfondie pour isoler et caractériser les principes actifs responsables de ces propriétés pharmacologiques et afin d'évaluer d'autres activités biologiques *in vitro* et *in vivo* de chacun de ces composés pris séparément.

BIBLIOGRAPHIE

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Amrit, P.S. (2000). A treatise on phytochemistry. Emedia Science Ltd, South Nutfield, Surrey, UK.
2. Abou-chaar, C.I., Shamlian, S. N. (1980). A Chromatographic Study of the Anthraquinones of *Rhamnus alaternus* L. I. Extraction, Isolation and Identification of the Aglycones. *Pharm. Biol.*, 18: 49-55.
3. Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M. (2000). The influence of natural products, upon drug discovery. *Nat. Pro. Rep.*, 17: 215-234.
4. Calixto, J.B. (2005). Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. *J. of Ethnophar.*, 100: 131-134.
5. World Health Organisation. (1999). Monographs on selected medicinal plants. Vol.1, Genève, Suisse.
6. Gurib-Fakim, A. (2006). Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Molecular Aspects of Medicine. *Med. Plan.*, 27:1-93.
7. Boizot, N., Charpentier, J.P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques. *INRA*, 79-82.
8. Maizak, K., Brac, D.L.P., Hammiche, V. (1993). Pharmacopée traditionnelle. Sahara septentrional. Actes du 2e colloque européen d'ethnopharmacologie, Heidelberg. 169-181.
9. Djebaili, S. (1984). Steppe algérienne. Phytosociologie et écologie. Ed. OPU, Ben-Aknoun, Alger, 177.
10. Bouattoura, N. (1988). Les ressources phytogénétiques. Importance Préservation-Utilisation. Annales, INA, El Harrach-Alger, 12 (1), T 1: 43-63.
11. Kansole, M.M.R. (2009). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques *lamiaceae* du Burkina Faso: cas de *Leucas martinicensis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia opposita vahl* et *Orthosiphon pallidus royle ex benth*. Mémoire pour obtenir un Diplôme (D.E.A) en Sciences Biologiques Appliquées, Burkina Faso.
12. Cuendet, M. (1999). Recherche de nouveaux composés capteurs de radicaux libres et antioxydants à partir d'une plante d'Indonésie : *Fagraea blumei* » (Loganiaceae) et de trois plantes d'altitude : *Bartsia alpina* (Scrophulariaceae), *Loiseleuria procumbens* (Ericaceae) *Campanula barbata* (Campanulaceae). Université de Lausanne. Thèse de doctorat, p 24.
13. Thomas, O.P. (2009). Métabolisme secondaire et Biosynthèse. Master 2 VEM. Université Nice Sophia Antipolis.
14. Gravot, A. (2008). Introduction au métabolisme secondaire chez les végétaux. Equipe pédagogique Physiologie Végétale, UMR 118 APBV. Université de Rennes 1-L2.
15. Vermerris, W. (2006). Phenolic compound biochemistry. Springer. Dordrecht. ISBN-1001-4020-5163-8 (HB).
16. Kone Donatien. Thèse de Doctorat (2009). "Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes- Extraction, identification d'Alcaloïdes - Caractérisation, quantification de polyphénols. Université Paul Verlaine - Metz (France).
17. Lutge, U., Kluge, M., Bauer, G. (2002). Botanique 3^{ème} Ed. Technique et documentation. Lavoisier .Paris. 211.
18. Abderrazak, M., Joël, R. (2007). La botanique de A à Z. Ed. Dunod. Paris. 177.
19. Bruneton, J. (2009). Pharmacognosie: phytochimie. plantes médicinales. 4^{ème} édition. Tech. Et Doc Lavoisier, Paris.

20. Bouvier, F., Rahier, A. et al. (2005). Biogenesis, molecular regulation and function of plant Isoprenoids. *Prog. Lipid Res.*, 44, 357-429.
21. Bamforth, C.W. (2000). Perceptions of beer foam. *J. Inst. Brew.*, 106: 229-38.
22. Lugasi, A., Hovari, J., Sagi, K.V., Biro, L. (2003). The role of antioxidant phytonutriments in the prevention of diseases. *Acta. Biol. Szegediensis*, 1-4: 119-125.
23. Dangles, O., Stoeckel, C., Wigand, M.C., Brouillard, R.(1992). Two very distinct types of anthocyanin complexation: Copigmentation and inclusion. *Tetrahedron Lett.*, 33: 5227-30.
24. Hagerman, A.E., Riedl, K.M., Jones, G.A., Sovik, K.N., Ritchard, N.T., Hartzfeld, P.W., Riechel, T L. (1998). High molecular weight plant phenolics (tannins) as biological antioxidants. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 1887-1892.
25. Sarni-Manchado, P., Cheynier, V. (2006). Les polyphénols en agroalimentaire. Ed Tec et Doc Lavoisier, 02-11.
26. Kening, Y., Vincenzo, D.L., Normand, B. (1995). Creation of a metabolic sink for tryptophan alters the phenylpropanoid pathway and the susceptiblity of potato to *Phytophthora infestans*. *The plant. cell.*, 7:1787-1799.
27. Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.*, 63, (7), 1035-42.
28. Higdon, J.V., Frei, B. (2003). Crit .Rev. *Food Sci. Nutr.*, 43, 89-143.47.
29. Wojdylo, A., Oszmianski, J., Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem*, 105: 940-949.
30. Sakurai, T., Kitadate, K., Nishioka, H., Fujii, H., Kizaki, K., Kondoh, Y., Izawa, T., Ishida, H., Radák, Z., Ohno, H. (2010). Oligomerized grape seed polyphenols attenuate inflammatory changes due to antioxidative properties in coculture of adipocytes and macrophages. *J. Nutr. Biochem*, 21. 47-54
31. Liu, S., Lu, H., Zhao, Q., He, Y., Niu, J., Debnath, A.K., (2005). The flavin derivatives in black tea and catechin derivatives in green tea inhibit HIV-1 entry by targeting gp 41. *Biochim. Bioph. Acta. (BBA)-Gen Subj.*, 1723, pp 270-81
32. <http://www.proto.org>. Page consultée le 20 avril 2015.
33. Lumbile, A.U., Mogotsi, K.K. (2008). Ficus sur Forssk. [Internet] Fiche de Protabase. Louppe D., Oteng-Amoako A. A. & Brink M.
34. Diawara, D. (2000). Les données statistiques sur les produits forestiers non-ligneux en république de Guinée programme de partenariat ce-fao [1998 - 2001], 41.
35. Daffalla, H.A.A. (2005). Studies on the constituents of *Ficus capensis* (Thunb). *Pak. J. soci. scien.*, 3: 751-754.42.
36. Oyeleke, S.B., Dauda, B.E.N., Boye, O.A. (2008). Antibacterial activity of *Ficus capensis*. *Afr. J. Biotech.*, 7:1414-1417.43.
37. Ahmadu, A.A., Zezi, A.U., Yaro, A.H. (2007). Anti-diarrheal activity of the leaf extracts of *Daniellia oliveri* Hutch and Dalz (Fabaceae) and *Ficus sycomorus* Miq [Moraceae]. *Afric. J. of Trad. Compl. and Alter. Medic. (AJTCAM)*, 4(4): 524-528.
38. Baborun, T. (1997). Substances Naturelles actives : La flore mauricienne une source d'approvisionnement potentielle. Université de Maurice. AMAS, *Food. Agr. Res. Coun, Réduit. Mauritius*, p 83.
39. Thomas, D.W. (1988). The influence of aggressive ants on fruit removal in the tropical tree, *Ficus capensis* (Moraceae). *Biotropica*, 20: 49-53.
40. Martin, S., Andriantsitohaina, R. (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*. 51: 304-315.

41. King, A., Young, G. (1999). Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *J. of the Amer. diet. associ.*,99:213-218.
42. Tapiero, H., Tew, K.D., Nguyen, B.G., Mathé, G. (2002). Polyphenol do they play a role in the prevention, of the human pathologies. *Biomed. pharma.* 56: 200-207.
43. Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie. Phytochimie-Plantes médicinales, 3^{ème} Ed Techniques et documentations. Paris. pp: 227-310-312-313-314.494.
44. Macheix, J.J., Fleuriot, F., Jay-Allemand, C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux : Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR presses polytechniques, p 134.
45. Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, B., Hras, A.R., Simonic, M., Knez, Z. (2005). Phenols, proanthocyanidines, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chem.*, 89: 191-198.
46. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Amer. J. of Clin. Nut.*, 79: 727-747.
47. Ribéreau-Gayon, G. (1968). Etude Des Mecanismes de Synthèse et de Transformation de L'acide Malique, de L'acide Tartrique et de L'acide Citrique Chez *Vitis Vinifera L.* *Phytochem.* 7 (9): 1471-82.
48. Anderson, C.M., Halleberg, A., Hogberg, T. (1996). Advances in the development of pharmaceutical antioxydants. *Adv. Drug. Res.*, 28, pp 65-180.
49. Igor Passi, L.B. (2002). Etude des activités biologique de *Fagara zanthoxyloïdes*, lam (Rutaceae). Thèse de pharmacie, Bamako, p 133.
50. Gonzalez, A.G., Estevez-Braun, A. (1997). Coumarins, *Nat. Prod. Reprod*, 14 : 465-475.
51. Harborne, J.B. (1997). Recent advances in chemical ecology. *Nat Prod Rep*, 14: 83-98.
52. Karamać, M., Pegg, R.B. (2009). Limitations of the tetramethylmurexide assay for investigating the Fe (II) chelation activity of phenolic compounds. *J. of Agric. and Food Chem.*, 57(14): 6425-6431.
53. Paris, M., Hurabielle. (1981). Abrégé de matière médicale. Pharmacognosie. Tome 1. Ed Masson. Paris.pp: 102-103-104-107.
54. Hemingway, R.W. (1992). Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives. In: Lpant polyphenols: synthesis, proprieties, significande. Laks P.E, Hemingway R.W New York.
55. Latte, L.P., Kolodziej, H. (2000). Antifungal effects of hydrolysable tannins and related compounds on dermatophytes, mould fungi and yeasts. *Naturforsch*, 5 (5-6): 467-72.
56. Leitao, D.P., Polizello, A.C., Ito, I.Y., Spadaro, A.C.(2005). Antibacterial screening of anthocyanic and proanthocyanic fractions from cramberry juice. *J. Med. Food*, 8 (1): 36-40.
57. Yamanaka, N., Samu, O., Nagao, S. (1996). Green tea catechins such as (-) epicatechin and (-) epigallocatechin accelerate Cu⁺² induced low density lipoprotein oxidation in propagation phase. *FEBS Lett*, 401: 230-4.
58. Cheruvanky, H. (2004) Method for treating hypercholesterolemia, hyperlipidemia and artherosclerosis. *United States Pathol.*, 6 (4): 733-99.
59. Notomo, H., Ligo, M., Hamada, H., Kojima, S., Isuda, H. (2004). Chemoprevention of colorectal cancer by grape seed proanthocyanidin is accompanied by a decrease in proliferation and increase in apoptosis. *Nutr. Cancer.*, 49 (1): 81-8.
60. Gosse, F., Guyot, S., Roussi, S., Labstein, A., Fisher, B., Seiler, N., Raul, F. (2005). Chemopreventive properties of apple procyanidins of human colon cancer-derived metastatic SW620 cells and in a rat model of edon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 26 (7): 1291-5.
61. Doat, J. (1978). Les tannins dans les bois tropicaux. *Rev. bois et forêts des trop*, 182, pp 37-54.

62. Ngom, N.M. (2001). Essai clinique randomise de l'*acacia nilotica* versus fluconazole dans le traitement de la candidose bucco-oesophagienne chez les personnes vivant avec le VIH/SIDA à Dakar. Thèse en pharmacologie, N 19.
63. Gérard Piquemal. « Les flavonoïdes ».phyto-aromathérapie.1 février 2010. <<http://www.detoursante.com>>.
64. Male Éév, D.É., Kuntiç, V. (2007). Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *J. Serb. Chem. Soc.*, 72: 921-939.
65. Guignard, J.L. (1996). Abrégé de biochimie végétale. Ed. Masson, Paris, 160 p
66. Lobstein, A. (2010). Substances naturelles et pharmacognosie, les alcaloïdes, pp 3-25.
67. Emerenciano, V. P., Barbosa, K.O., Scotti, M.T., Ferriro, M.J.P. (2007). Self organising maps in chemotaxonomic studies of Asteraceae: a classification of tribes using flavonoid data. *J. of braz. Chem. Soci.*, 18 (5): 891-899.
68. Narayana, K.R., Reddy, M.S., Chaluvadi, M.R., Krishna, D.R. (2001). Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Ind. J.of pharm.*, 33: 2-16.
69. Malešev, D., Kuntiç, V. (2007). Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *J. of Serb. chem. Soci.*, 72 (10): 921-939.
70. Grisebach, H. (1965): Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, T.W Goodwin éditeur, Academic Press, New York.
71. Richter, G., (1993). Métabolisme des végétaux. Physiologie et Biochimie. (Ed.) Presses Polytechniques et Universitaire Romandes, pp 322-323.
72. Marfak, A. (2003). Radiolyse gamma des flavonoïdes, Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation de depsides, thèse de doctorat, Limoges.
73. Bouakaz, I. (2006). Etude phytochimique de la plante *Genista Microcephala*, Mémoire de master, Batna.
74. Heim, E.K., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. of Nutrit. Biochem.*, 13: 572-584.
75. Hendrich, A.B. (2006). Flavonoid-membrane interactions: possible consequence for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta pharmaco Sinica.*, 27: 27-40.
76. Santos-Buelga, C., Escibano-Bailon, M.T. (2003). Polyphenols Extraction from Foods. in: Methods in Polyphenol Analysis (eds. C. Santos-Buelga, G. Williamson). Royal Society of Chemistry, Cambridge, United Kingdom, pp. 1-16.
77. Wang, L.Y., Wang, N.L., Yao, X.S., Miyata, S., Kitanaka, S. (2003). Euphane and tirucallane triterpenes from the roots of *Euphorbia kansui* and their in vitro effects on the cell division of *Xenopus*. *J. Nat. Prod.*, 66, 630.
78. Geleijnse, JM., Hollman, PCh. (2008). Flavonoids and cardiovascular health: which compounds, what mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.*, 88(1):12-3.
79. Heller, W., Forkmann, G. (1993). Biosynthesis of Flavonoids, in *The Flavonoids: Advances in research since 1986*. Chaman and Hall, London, UK, pp-499-536.
80. Wollenweber, E. (1994). Flavones and flavonols. I.J.Harborne Edition, *the Flavonoids Advances Research since 1986* Academic Press, London. Chaman and Hall, London, UK, pp 259-335.
81. Caccamese, S., Caruso, C., Parrinello, N., Savarino, A.J. (2005). High-performance liquid chromatographic separation and chiroptical properties of the enantiomers of naringenin and other flavanones. *Chromatogr. A*, 1076(1-2) :155-62.

82. Bruneton, J. (1987). *Eléments de phytochimie et de pharmacognosie*, Technique & Documentation Lavoisier, Paris.
83. Mazza, G., Miniati, E. (1993). Anthocyanins in Fruits, Vegetables and grains, CRC Press: *Boca Raton*, p. 234, 132, 88.
84. Kong, J.M., Chia, L.S., Goh, N.K., Chia, T.F., Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochem.*, 64, 923–933.
85. Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (2000). American Society of Plant Physiologists, chapitre 24, pp 1250-1318.
86. Van Acker, S.A.B.E.; Van Den Berg, D.j., Tromp, M.N.J.L., Griffioen, D.H., Van Bennekom, W.P., Van Der Vijgh, W.J.F., Bast, A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Rad. Bio. and Med.*, 20, (3), 331-342.
87. Sroka, Z. (2005). Antioxidative and antiradical properties of plant phenolics. *Z. Naturforsch.*, 60, (11-12), 833-843.
88. Aliaga, C., Lissi, A.E. (2004). Comparison of the free radical scavenger activities of quercetin and rutin an experimental and theoretical study. *Can. J. Chem.*, 82, 1668-1673.
89. Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharidies, T.C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharma. reviews*, 52: 673- 751.
90. Amic, D., Amic, D.D., Beslo, D., Trinajst, N. (2003). Structure-Radical Scavenging Activity Relationships of Flavonoids. *Croat. Chem. ACTA*, 76, (1), 55-61.
91. Paris, R.R., Moyse, H. (1965), *Précis de matière médicale*, Tome 1, Masson et Cie, Editeurs.
92. Gars, S.N., Charles, R., Kumar, S. (1999). A new cyclic monoterpene glucoside from the capitula of *Tagetes patula*, *Fitoterpia*, 70, 5, 472- 474.
93. Randriamiharisoa, P.R. (1983). Contribution à l'étude analytique et structurale des différents grades d'huile essentielle d'Ylang-Ylang (*Canangium odoratum Genuina*).
94. Lamarty, R., Menot, C., Molanguï, T., Valade, I., Rasoanaivo, P., Petit Jean, A. (1993). Huiles essentielles de quelques plantes aromatiques malgaches. Fifth NAPREKA. *Symp. on Nat. Prod.*, Septembre 19-23.
95. Ramanandrize, V. (1995). Contribution à l'étude des huiles essentielles de feuilles et de fruits de *Pittosporum viridiflorum Pittosporaceae*. Mémoire de DEA de Chimie Organique, Option "Produits Naturels", Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo Madagascar.
96. Bruneton, J. (1993). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*, Technique & documentation, Lavoisier, Paris.
97. Randriamanantoanina, H.C. (1984). Extraction d'arômes alimentaires : cas du gingembre. Mémoire d'Ingéniorat de l'E.E.S.S.A - IAA, Université d'Antananarivo Madagascar.
98. Dey, P.M., Harborne, J.B. (1991): *Methods in plant biochemistry*. Volume 7, Terpenoids. Academic press.
99. Manitto, P. (1981). *Biosynthesis of natural products*. John Willey et sons. New York.
100. Loomis, D., Croteau, R. (1980). *Biochemistry of Terpenoids: A Comprehensive Treatise*. In: P. K. Stumpf and E. E. Conn (eds.) *The Biochemistry of Plants. Lipids: Structure and Function* No. 4. p 364-410. Academic Press, San Francisco.
101. Allen, K.G., Banthorpe, D.V., Charlwood, B.V. (1977). Metabolic pools associated with monoterpene biosynthesis in higher plants. *Phytochem.* 16, 79-83.
102. Harborne, J.B. (1991). Recent advances in the ecological chemistry of plant terpenoids. In *Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids*, F.A. eds (Oxford: Clarendon Press.), pp 396-426

103. Bauer, K., Garbe, D., Surburg, H. (2001). *Common Fragrance and Flavour Materials: Preparation, Properties and Uses* Wiley-VCH, Weinheim.
104. Gershenzon, J., McConkey, M.E. (2000). Regulation of monoterpene accumulation in leaves of *peppermint*. *Plant Physiol.*, 122, 205-213.
105. Van de Braak, S.A.A.J., Leijten, G.C.J.J. (1999). *Essential Oils and Oleoresins*, CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam.
106. Paduch, R., Kandefor-Szerszeń, M., Trytek, M., Fiedurek, J. (2007). Terpenes: substances useful in human healthcare. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 55, 315-327.
107. Crowell, A.L., Williams, D.C. (2002). Molecular cloning and characterization of a new linalool synthase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 405, 112-121.
108. Jacotot, B., Campillo, B. (2003). *Nutrition humaine*. Elsevier Masson. Paris.
109. Uzzan, A. (1984). Propriétés et emploi des huiles et graisses. In: *Manuel d'alimentation humaine*, JACQUOT, R., et al. Tome 2, Edition : ESF, Paris, 226-230.
110. Sargent, J.R., Bell, M.V., Henderson, R.J., Tocher, D.R. (1989). *The lipids*. Fish nutrition, ed. H. J, New York: Academic. 153-218.
111. Wakeham, S.G. (1985). Wax esters and triacylglycerols in sinking particulate matter in the *Peru upwelling area (15° S, 75° W)*. *Marine Chem.*, 17(3): p. 213-235.
112. Wolf, J.P. (1992). *Manuel des corps gras*, A. Karleskind, éd. Lavoisier Paris
113. Viola, P. (1998). *L'olivier, l'huile d'olive* Conseil Oléicole International, 115p.
114. Arleskin, D. (1992). *Manuel des corps gras* Edition Lavoisier, 1500p
115. Jacotot, B. (1993). *L'huile d'olive de la gastronomie à la santé* Paris: Artulen, 280p.
116. Merrien, A., Morice, J., Pouzet, A., Morin, O., Sultana, C. (1992). *Graines oléagineuses des climats tempérés et leurs huiles*. A. Karleskind ed, M.d.C. Gras, Paris: Tec&Doc 116- 164.
117. [http :www.europa.eu.int/huile/olive](http://www.europa.eu.int/huile/olive). Page consultée le 2 mars 2015.
118. Viola, P. (1997). *L'huile d'olive et la santé* Madrid : Conseil Oléicole International, 122p.
119. Simopoulos, AP., Visioli, F. (2000). Mediterranean diets *World. Rev. Nutr. Diet.*, 87, p56-77.
120. Leger, CL. (1999). Les composés phénoliques et leurs propriétés biologiques. *Corps Gras Lipides*, 6 (1) : p60-63
121. Ryan, D. (1998). Evaluation de la qualité de l'huile d'olive *Olivae*, 72 : p23-33.
122. www.memoireonline.com/11/07/687/extraction-caracterisation-biochimique-huile-dargan.html. Page consultée le 10 juin 2011.
123. Fuse, T.; Kusu, F.; Takamura, K. (1997). Determination of acid values of fats and oils by flow injection analysis with electrochemical detection. *J. Pharm. Biomed. Anal*, 15, 1515.
124. Kuselman, I., Tur'yan, Y.I., Burenko, T., Goldfeld, I., Anisimov, B. (1999). pHmetric determination of acid values in oilseeds without titration. *Talanta*, 49, 629.
125. Achinewhu, S.C. Akpapunam, M.A. (1985). Physical and chemical characteristics of refined vegetable oils from rubber seed (*Hevea brasiliensis*) and bread-fruit, *plant Foods for Human Nutr.*, 35, 103-107.
126. Ekoumou, C. (2003). *Etudes phytochimiques et pharmacologiques de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite*. Thèse pharmacie, Bamako, 145 p.
127. Tessier, F., Marconnet, P. (1995). Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice. *Scien. et Sport.*, 10: 01-13.
128. Koechlin-Ramonatxo, C. (2006) Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases. *Nutr. Clin. et Métab.*, 20, 165- 177.
129. Dacosta, Y. (2003). *Les phytonutriments bioactifs*, Ed Yves Dacosta, Paris, 317 p.

130. Vansant, G. (2004). Radicaux libres et antioxydants : principes de base, Ed Institut Danone.
131. Boyd, B., Ford, C., Koepke Michael, C., Gary, K., Horn, E., McAnalley, S., McAnailey, B. (2003). Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé. *Gly. Sci. & Nutr.*, 4 (6), 7.
132. Favier, A. (2003a). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actu. chim.*, 108-115.
133. Delattre, J. J.L., Beaudoux, Bonnefont- Rousselot, D. (2005a). Radicaux libres et stress oxydant, *asp. biol. et patholo.*, 1- 23.
134. Curtay, J.P., Robin, J.M. (2000). Intérêt des complexes antioxydants. *Nutrithérapie Info*. 4p.
135. Tarnawski, M., Depta, K., Grejciun, D., Szelepin, B. (2006). HPLC determination of phenolic acids and antioxidant activity in concentrated peat extract - a natural immunomodulator. *J of Pharm. and Biomed. Anal*, 41: 182-188.
136. Jacob, L. (2007). L'insuffisance rénale aiguë. Edition Springer, p 88
137. Hadj Salem, J. (2009). Extraction, Identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de *Nitraria retusa* et synthèse de dérivés acyles de ces molécules par voie enzymatique. Thèse de Doctorat : Université de Lorraine.
138. Favier, A. (2003 b). Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actu. Chim.*, 17: 501-512.
139. Bonnet, C., Alamigeon, F., Micheels, P. (2010). Guide complet des soins esthétiques : du coté de ma vie. Edition Eyrolles, p 14.
140. Pincemail, J., Defraigne, J.O. (2003). Le CoEnzyme Q10 ou ubiquinone: un antioxydant particulier. *Vaisseaux, Coeur, Poumons*, 18 (2), 55-60.
141. Bonnefont-Rousselot, D., Thérond, P., Delattre, J. (2003). Radicaux libres et anti-oxydants. IN : Biochimie pathologique : aspects moléculaires et cellulaires. Delattre, J ., Durand, G ., Jardillier, J.C. Eds: Médecine-sciences. Flammarion (Paris), Pp: 59-81
142. David Jourd'heuil, David Kang, Matthew, B., Grisham. (1997). Interactions between super-oxide and nitric-oxide: implication in DNA damage and mutagenesis *Front. Bioscience*, 2, 189-196.
143. Diallo, A. (2005). Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* willd. (Myrtaceae). Thèse de Doctorat. Université de Bamako, Mali.
144. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1999). Free radicals in biology and medicine, Oxford, UK.
145. Halliwell, B., (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am. J. Med.*, 91(3C):14S-22S
146. Hale, A.L. (2003) Screening Potato Genotypes for Antioxidant Activity, Identification of the Responsible Compounds, and Differentiating Russet Norkotah Strains Using Aflp and Microsatellite Marker Analysis. Office of Graduate Studies of Texas A&M University.
147. Diplok, A.T. (1991). Antioxydant nutriments and disease prevention: an Overview. *Am. J. Clin. Nutr.* ; 53 (suppl): 189S-93S.
148. Pelletier, E., Campbell, P. G. C., Denizeau, F. (2004). Écotoxicologie moléculaire : Principes fondamentaux et perspectives de développement. Edition PUQ, p 182.
149. Mates, J.M., Pérez-Gomez, C., De Castro, I.N. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.*, 32(8): 595-603.
150. Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., Pessarakli, M. (2012). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany* , 1-26

151. Théron, P., Bonnefont-Rousselot, D., Davit-Spraul, A., Conti, M., Legrand, A. (2000). Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 3(5):373-84.
152. Droillard, M.J., Paulin, A. (1990). Isozymes of superoxide dismutase in mitochondria and peroxisomes isolated from petals of carnation (*Dianthus caryophyllus*) during senescence. *Plant Physiol.*, 94 (3), 1187-1192.
153. Arisi, A.C.M., Cornic, G., Jouanin, L., Foyer, C.H. (1998). Overexpression of iron superoxide dismutase in transformed poplar modifies the regulation of photosynthesis at low CO₂ partial pressures or following exposure to the prooxidant herbicide methyl viologen. *Plant Physio.*, 117 (2), 565-574.
154. Van Antwerpen, P. (2006). Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique: Ciblage du système myeloperoxydase ,peroxyde d'hydrogène /chlorure. Thèse de doctorat en Sciences Pharmaceutiques, Académie universitaire Wallonie-Bruxelles.
155. Jacques, B., André, R. (2004). Biochimie métabolique Ed ellipses .Paris. pp: 217-219- 220-223-225.
156. Yoshimoto, M., Sakamoto, H., Yoshimoto, N., Kuboi, R., Nakao, K. (2007). Stabilization of quaternary structure and activity of bovine liver : Catalase through encapsulation in liposomes. *Enzy and Microb. Techn.*, 41, 849–858.
157. Nicholls, P. (2012). Classical catalase: Ancient and modern. *Arch. of Biochem. and Biophy.*, 525, 95–101.
158. Bédane, C. (2008). Photodermatologie : Photobiologie cutanée, photoprotection et photothérapie. Edition Wolters Kluwer France, p 20.
159. Perron, Linda. (2003). L'exposition aux anti-inflammatoires non stéroïdiens et aux antihypertenseurs et le risque de cancer de la prostate Philosophiæ doctor (Ph.D.)Université Laval.
160. Evans, J.L., Goldfine, I.D., Maddux, B.A., Grodsky, G.M. (2002). Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabets, *Endocr Rev*, 23: 599-622.
161. Packer, L., Tritschler, H.J., Wessel, K. (1997). Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid, *Free Radic. Biol. Med.*, 22: 359 – 378.
162. Bossokpi, I.P.L. (2002). Etude des activités biologiques de *Fagara xanthoxyloïdes* LAM (Rutaceae). Thèse de pharmacie, Bamako, 133 p.
163. Ohrvall, M. Sundlöf, G., Vessby, B. (1996). Tocopherols and heart disease nutrition report: 20/ Gamma, but not alpha, tocopherol levels in serum are reduced in coronary heart disease patients, *J. of Inter. Med.*, 239:111-117.
164. Ahmet, S.(2003).Thèse pharmacie. Etude phytochimique et des activités biologiques de *Balanites aegyptica* (Balanitaceae) .Bamako ;p.117.
165. Wang, X., Quinn, P.J. (2006).The structure and phase behaviour of α -tocopherol- rich domains in 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylethanolamine. *Biochim.*, 88, 1883-1888.
166. Annaházi, A., Mracskó, E., Süle, Z., Karg, E., Penke, B., Bari, F. & Farkas, E. (2007). Pre-treatment and post-treatment with α -tocopherol attenuates hippocampal neuronal damage in experimental cerebral hypoperfusion. *Europ. J. of Pharmac.*, 571, 120–128.
167. Krinsky, NI.(1993). Actions of carotenoids in biological systems. *Annu. Rev. Nutr.*,13:561-587.
168. Biesalski, H.K., Hemmes, C., Hopfenmuller, W., Schmid., Gollnick, H.P. (1996) Effects of controlled exposure of sunlight on plasma and skin levels of beta-carotene. *Free Radic. Res.*, 24: 3. 215-224.

169. Allard, J., Royall, D., Kurian, R., Muggli, R., Jeejee bhoy, K. (1994). Effects of β -carotene supplementation on lipid peroxidation in humans, *Am. J. Clin. Nutr.*, 59: 884 – 90.
170. Biesalski, H.K., Hemmes, C., Hopfenmaller, W., Schmid, C., Gollnick, H.P. (1996). Effects of controlled exposure of sunlight on plasma and skin levels of β -carotene. *Free Radio. Res.*, 24 : 215-224.
171. Timbo, Binta. (2003). Thèse de pharmacie. Etude phytochimique et des activités biologiques de *Trichilia Emetica* Vahl (Meliaceae).
172. Lee, K.Y., Weintraub, S.T., Yu, P.B. (2000). Isolation and Identification of Phenolic Antioxidant from *Aloe barbadensis*, *Free Rad. Biol. Med.*, 28,261.
173. Kumaran, A., Karunakaran, R. (2007). Activity-guided isolation and identification of free radical-scavenging components from an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chem.*, 100. 356–361.
174. Carl-Magnus, Andersson, Anders Hallberg, Thomas Högberg. (1996). Advances in the development of pharmaceutical antioxidants. *Adv. Drug Res.*, 28, 65–180.
175. Cavin Alexandre. (1999). Thèse de Doctorat. Investigation phytochimique de 3 plantes indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires : *Tinospora crispa* (Menispermaceae), *imerrenia emarginata* (Convolvulaceae) et *Orophea enneandra* (Annonaceae). lausanne Suisse 241-243.
176. Favier, A. (2004). Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann. Pharm. Fr.*, 2006; 64: 390-396.
177. Ekoumou, Coene. (2003) Etude phytochimique et pharmacologique de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et la cystite. Thèse, Pharmacie, FMPOS, Bamako, n° 14, 145 p.
178. Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. of Agric. and Food Chem.*, 53(10): 4290-4302.
179. Kaufmann, S.H.E. (1997). Host response to intracellular pathogens. New York. 345 p.
180. Avril, J.LO, Dabernat, H., Denis, F., Montiel, H. (1992). Bactériologie clinique, 2^{ème} édition Marketing, p 277-279.
181. Nicklin, J., Graeme-cook, K., Paget, T., Killington, R. (2000). L'essentiel en Microbiologie, Paris, Berti édition.
182. Bayoud, B. Mémoire de magister. (2005). Etude phytochimique et extraction améliorée des alcaloïdes tropaniques du *Datura stramonium* L. Solanaceae. UBMA.
183. Elghozi, J.L., Duval, D. (1992). Pharmacologie 2^{ème} Ed : Médecine Flammarion. Paris. 289p.
184. Billing, J., Sherman, P.W. (1998). Antimicrobial Functions of Spices: Why Some Like it Hot. *Q. Rev. Biol.*, 73: 3-49.
185. Cowan, M.M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12: 564-582.
186. Nauciel, C. (2000). Bactériologie médicale. Masson (Ed). Paris, 276p.
187. Percival, S.L. (2004) Microbiology of waterborne diseases. Ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam; Boston, p. 480.
188. Richard, C., Kiredjian, M. (1995). Méthodes de laboratoire pour l'identification des bacilles à gram négatif aérobies stricts : *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Brucella*, *Bordetella*. 2^{ème} édition. Ed Institut. Pasteur. Paris. pp: 42-43.
189. Medjbar, M., Bouyoucef, A., Benayad, T., Zerrouki, K. (2008). Caractérisation des salmonelles dans les tueries avicole de la wilaya de Blida. Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie. pp : 158-161.

190. Patrick, B., Jean, L., Michel, S. (1988). Bactériologie : Les bactéries des infections humaines. 1^{er} Ed Médecine –Sciences Flammarion. Paris. pp: 100-108-274.
191. Steven, P., Rachel. C., Martha. E., Paul. H., Jane. S., and Peter W.J. (2004). Microbiology of Waterborne Diseases. Ed Elsevier Academic Press. pp: 71-132
192. Nataro, J.P., Kaper, J.B. (1998). Diarrheagenic E. coli. *Clin. Microbiol. Rev.*, 11 : 142-201.
193. Avril J.L. (1991). Dictionnaire pratique de bactériologie générale. Edition Ellipses-Marketing, Beecham-Sévigné, Paris, p 43.
194. Fuerst, F. (1976). Microbiologie Clinique. Ed HRW Quèbec. 507.
195. Pieri, F., Kirkiacharian, S. (1992). Pharmacologie et Thérapeutique, 2^{ème} édition marketing. Paris. 443 p.
196. Delorme, J., Robert, A. (1997). Mycologie médicale. Ed. Centre collégial de développement de matériel didactique, Mont-Royal Québec, p. 184.
197. Avril, J.L., Dabernat, H., Denis, F., Monteil, H. (2000). Bactériologie clinique. 3^{ème} édition Ellipses (Ed) Paris, 602 p.
198. Chambers, H.F. (1997). Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.*, 10 : 781-791.
199. Dworkin, M.M., Falkow, S. (2006). Proteobacteria : Gamma subclass. Ed. Springer, New York, NY, p. 1248.
200. Fauchère, J.L., Avril, J.L (2002). Bactériologie générale et médicale. Edition Ellipses, Paris.
201. <http://www.bacteriologie.net/generale/antibiogramme.html>. Page consultée le 15 mars 2015.
202. Duval, J., Soussy, C.J. (1980). Abrégé d'antibiothérapie ; bases bactériologiques pour l'utilisation des antibiotiques. C. J. Published by Paris, Masson.
203. N. Toudert, thèse de doctorat. (2011). Etude phytochimique et évaluation de quelques activités biologiques de *Ampelodesma mauritanica*. Université Badji Mokhtar, Annaba.
204. Ozenda, P., 1991. Flore et végétation du Sahara. In : CNRS (Ed.), Paris.
205. Ahmad, V.U., Hussain, H., Hussain, J., Jassbi, A.R., Bukhari, I.A., Yasin, A, Choudhary, M.I., Dar, A.(2002). New bioactive diterpenoids from *Euphorbia decipiens*. *Z Naturforsch*, 57 b, 1066-71.
206. Charles, C.D., Maribeth, L., Daniel, L.N., Kenneth, J.W., David, A.B. (2007). Floral gigantism in Rafflesiaceae. Science Express, USA.
207. Ali, I., Naz, R., Khan, W.N., Gul, R. (2009). Biological screening of different root extracts of *Euphorbia wallichii*. *Pak. J. Bot*, 41: 1737-1741.
208. Spichiger, R.E., Savolainen, V.V., Figeat, M. (2000). Botanique systématique des plantes à fleurs. Ed. Presse polytechniques et universitaires Romandes, Lausanne.
209. Webster, G.L. (1987). The saga of the spurge: a review of classification and relationships in the Euphorbiales. *Botan. J. of Linnean. Soci.*, 94, 3-44.
210. Defelice, L.P. (1967). Guide pour l'étude de quelques plantes tropicales. Gauthier-Villars. Paris.
211. Bruneton, J. (1996). Plantes toxiques : Végétaux dangereux pour l'homme et les animaux. Technique et documentation, Paris.
212. Jassbi, A.R. (2006). Chemistry and biological activity of secondary metabolites in *Euphorbia* from Iran. *Phytochemistry*, 67: 1977-1984.
213. Bellakhdar, J. (1997). La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle. Ibis Press.
214. Quezel, P., Santa, S. (1963). Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. In : CNRS (Ed.), Vol. 1-2. Paris.
215. Gordon, C. (1997). Botanica Encyclopédie de botanique de botanique et d'horticulture plus de 10000 plantes du monde entier. Ed. Colonne : Könemann.

216. Florence, J. (1997). Flore de la Polynésie Française *Cnabiaceae, Ceropiaceae, Euphorbiaceae. Moraceae*, 1, 393 p.
217. Berthelot, A., Bertband, D.M. (1912). The Intestinal Flora, Isolation of a Microbe Capable of Producing P-Iminazolylet hylamine from *Histidine*. *J. veget. Physio. and agricult.*, 668-679.
218. Bruneton, J. (2009). Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales. 4^{ème} Ed. Éditions médicales internationales (Tec & Doc), Paris, 1288.
219. Champy, P., Cheikh-Ali, Z., Adiko, M., Bouttier, S., Bories, C., Okpekon, T., Poupon, E. (2011). Composition, and antimicrobial and remarkable antiprotozoal activities of the essential oil of rhizomes of *Aframomum sceptrum* K. Schum. (*Zingiberaceae*). *Chem. Biodiv*, 8, 658-67.
220. Schulte, R.E. (1987). Members of *Euphorbiaceae* in primitive and advanced societies. *Botan .J. of Linnean Soci.*, P: 94, 77-96.
221. Hernández, T., Canales, M., Avila, J.G., Duran, A., Caballero, J., Romo de Vivar, A., Lira, R. (2003). Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). *J. Ethnopharm.*, 88 (2-3), P: 181-188.
222. Polat, R., Satıl, F. (2012). An ethnobotanical survey of medicinal plants in Edremit Gulf (Bahkesir- Turkey), *J. Ethnopharmacol.* ,139, 626-641.
223. Ezer, N., Avcı, K. (2004). Çerkes. (Çankın) yöresinde kullanılan halk ilaçları, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 24(2), 67-80.
224. Altundağ, E., Öztürk, M. (2011). Ethnomedicinal studies on the plant resources of East Anatolia, Turkey, *Procedia. Soc. Behav. Sci.*, 19, 756-777.
225. Tabata, M., Sezik, E., Honda, G., Yesilada, E., Fukui, H., Goto, K., Ikeshiro, Y. (1994). Traditional Medicine in Turkey III. Folk Medicine in East Anatolia, Van and Bitlis Provinces, *Int. J. Pharmacog.*, 32(1), 3-12.
226. Duarte, N., Ferreira, M.J., Martins, M., Viveiros, M., Amaral, L. (2007). Antibacterial activity of ergosterol peroxide against *Mycobacterium tuberculosis*: dependence upon system and medium employed. *Phytother. Res.*, 21(7): 601-4.
227. Yu, F.R., Lian, X.Z., Guo, H.Y., McGuire, P.M., Li, R.D., Wang, R., Yu, F.H. (2005). Isolation and characterization of methyl esters and derivatives from *Euphorbia kansui* (Euphorbiaceae) and their inhibitory effects on the human SGC-7901 cells. *J. Pharm.Sci.*, 8(3): 528-35.
228. Bani, S., Kaul, A., Khan, B., Gupta, V.K., Satti, N.K., Suri, K.A., Qazi, G.N.(2007). Anti-arthritic activity of a biopolymeric fraction from *Euphorbia tirucalli*. *J. Ethnopharm.*, 110(1): 92-8.
229. Yang, C.M., Cheng, H.Y., Lin, T.C., Chiang, L.C., Lin, C.C. (2005). *Euphorbia thymifolia* suppresses herpes simplex virus-2 infection by directly inactivating virus infectivity. *Clin Exp Pharmacol. Physio.*, 32(5-6): 346-9.
230. Sadeghi-Aliabadi, H., Sajjadi, E.S., Khodamoradi, M. (2009). Cytotoxicity of *Euphorbia macroclada* on MDA-MB-468 Breast Cancer Cell Line. *Iran J of Pharm Sci*, 5(2), 103-108.
231. Lanhers, M.C., Nicolas, J.P. (2005). Fleurentin, J., Weniger, B. *Euphorbia hirt* L. *J. Etnopharmacol.*, 36. 9-23.
232. Elhassan, G.O.M., Adhikari, A., Abdalla, O.M., Khalid, A., Choudhary, M.I., Mesaik, M.A., Yagi, S. (2015). Chemical Constituents of *Euphorbia Polyacantha* Boiss and their Immunomodulatory Properties. *Rec. Nat. Prod.*, 1, 146-152.
233. Al-Quran, S. (2009). Ethnopharmacological survey of wild medicinal plants in Showbak, Jordan. *J. Ethnopharma.*, 123, 45-50.

234. Nazar, U.I., Islam, I.K., Abdur R., Naveed M., Muhammad Shahid M.R.S. (2015). Antinociceptive, muscle relaxant and sedative activities of gold nanoparticles generated by methanolic extract of *Euphorbia milii*. *BMC Complementary and Alternative. Medicine*, 15:160.
235. Rahman, A.H.M.M., Akter, M. (2013). Taxonomy and Medicinal Uses of *Euphorbiaceae* (*Spurge*) Family of Rajshahi, Bangladesh. *Res. in Plant Sci.*, 1(3), 74-80.
236. <http://www.tela-botanica.org/isfan-nn-142995> affichée le 14 février 2014.
237. http://crdp.ac-besancon.fr/flore/Euphorbiaceae/especes/euphorbia_biumbellata.htm. le 14 février 2014.
238. Blanc, P., Sacqui-Sonnes, G. (1972). Flavonoids of *E. hirta*. *Plant Med. Phytothera*, 6: 106–109.
239. Kumar, S., Malhotra, R., Kumar, D. (2010). *Euphorbia hirta*: Its chemistry, traditional and medicinal uses, and pharmacological activities. *Pharmaco. Rev.*, 4. p. 58.
240. Yoshida, T., Chen, L., Shingu, T., Okuda, T. (1988). Tannins and related polyphenols of *Euphorbiaceous* plants. IV. *Euphorbins* A and B, novel dimeric dehydroellagitannins from *Euphorbia hirta* L. *Chem. Pharm. Bull*, 36, 2940-2949.
241. Neha Tiwaria, A.M., Anil Chaudhary. (2010). Phytochemical Screening and Antioxidant Activities of Some Indian plants, *Sch. Res. Libr. Der.*, 2, 5, 335-340.
242. Wu, Y., Qu, W., Geng, D., Liang, J.Y., Luo, Y.L. (2012). Phenols and flavonoids from the aerial part of *Euphorbia hirta*. *Chin. J. Nat. Med.*, 10, 1, 40-42.
243. El-menshawi, B.S. (2013). Extracts for in vitro anti-tumor and pro-apoptotic activities on humantumor cell lines, and lethality to brine shrim, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 5, no. x.
244. Sudhakar, M., Rao, C.V., Rao, P.M, Raju, D.B, Venkateswarlu, Y. (2006). Antimicrobial activity of *Caesalpinia pulcherrima*, *Euphorbia hirta* and *Asystasia gangeticum*, *Fitoterapia*, 77, 378-380.
245. Abubakar, E.M. (2009). Antibacterial activity of crude extracts of *Euphorbia hirta* against some bacteria associated with enteric infections. *J. Med. Plant. Res.*, 3(7): 498-505.
246. Basma, A.A., Zakaria, Z., Latha, L.Y., Sasidharan, S. (2011). Antioxidant activity and phytochemical screening of the methanol extracts of *Euphorbia hirta* L., *Asian. Pac. J. Trop. Med.*, 386-390.
247. Ogbulie, J.N., Ogueke, C.C., Okoli, I.C., Anyanwu, B.N. (2007). Antibacterial activities and toxicological potentials of crude ethanolic extracts of *Euphorbia hirta*. *Afric. J. Biotechnol.*, 6, July, 1544–1548.
248. Wong-Ting-Fook, W.T.H. (1980). The medicinal plants of Mauritius. ENDA publication No. 10, Dakar.
249. Igoli, J.O., Ogaji, T.A0, Tor-Anyiin Igoli, N.P. (2005). Traditional Medicine Practice Amongst the Igede People of Nigeria. Part II. *Afric. J. Trad, Compl. Alt. Med.*, 2(2), 134-152.
250. Durrani, A.A., Rafiullah, M., Ikram, M. (1967). *Euphorbia helioscopia* Linn. *Pak. J. Sci. & Ind. Res.*, 10(3), 167-170.
251. Zhang, W., Guo, Y.W. (2006). Chemical studies on the constituents of the Chinese medicinal herb *Euphorbia helioscopia* L. *Chem. Pharm. Bull.*, 54(7), 1037-1039.
252. Abou-El-Hamd, M.F.M., Mohameda, H., Mohamed-Elamir, F., Hegazyb, H., Moustafac, P.W.P., Magdi, A., El-Sayedd, Ibrahim, B., Abdel-Faridd, Abeer M., Esmaila, Mohamed, H., Abdelrazike, N.S., Mohameda, Gomah Nenaahf, Tarik, A., Mohamedb, Abdelaaty, A., Shahatb, J., Karchesyg, Hisashi Matsudah. (2012). *Euphorbia Héliosopia* chemical constituents and biologicalactivities. *Int. J. Phytopharm.*, 3, 1, 78-90.

253. Qureshi, RA., Ahmed, M., Ghufraan, MA. (2007). Indigenous knowledge of some important wild plants as a folk medicines in the area of Chhachh (Distt. Attock) Punjab, Pakistan. *EJEAFChe.*, 6(11), 2500-2511.
254. Ahmed, S., Ali, A., Bibil, S. (2006). Ethnobotanical study on some medicinal plants of Ouch district lower Dir, Paki. *Pak. J. Pl. Sci.*, 12(1), 65-71.
255. Al-Qura'n, S. (2009). Ethnopharmacological survey of wild medicinal plants in Showbak, Jordan. *J. Ethnopharma.*, 123, 45-50.
256. Feng, W.S., Gao, L., Zheng, X.K. (2009). A new aryl glycoside from *Euphorbia helioscopia* L. *Chin. Chem. Lett.*, 20, 181-183.
257. Feng, WS., Gao L, Zheng, X.K., et al. (2010). A new lathyrane diterpene glycoside from *Euphorbia helioscopia* L. *Chin. Chem. Lett.*, 21, 191-193.
258. Li, H.B., Cheng, K.W., Wong, C.C., Fan, K.W., Chen, F., Jiang, Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chem.*, 102: 771-776.
259. Lu, Z.Q., Guan, S.H., Li, X.N., et al. (2008). Cytotoxic diterpenoids from *Euphorbia helioscopia*. *J. Nat. Prod.*, 71, 873-876.
260. Chaudhry, B.A0, Janbaz, K.H0, Uzair, M., et al. (2001). Biological studies of Conyza and *Euphorbia* species. *J. Res. Sci.*, 12(1), 85-88.
261. Al-Qura'n, S. (2005). Ethnobotanical survey of folk toxic plants in southern part of Jordan. *Toxicon*, 46, 119-129.
262. http://crdp.ac-besancon.fr/flore/Euphorbiaceae/especes/euphorbia_dendroides.htm. le 06 janvier 2014.
263. Giilz, P.G., Franz, J.M, Jutta B. (1987). Epicuticular Leaf Wax of *Euphorbia Dendroides* L., *Euphorbiaceae*. *Zeit. Fur Natur - Section C Journal of Biosc.*, 42 (3): 191-96.
264. Corea, G., Fattorusso, E., Lanzotti, V., Tagliatalata-scafati, O., Appendino, G., Ballero, M. (2003). Modified Jatrophone Diterpenes as Modulators of Multidrug Resistance from *Euphorbia Dendroides* L. *Bioorg. Med. Chem.*, 11, 5221-5227.
265. Barile, E., Borriello, M., Di Pietro, A., et al. (2008). Discovery of a new series of jatrophone and lathyrane diterpenes as potent and specific P-glycoprotein modulators. *Org. Biomol. Chem.*, 6, 1756-1762.
266. Silpa Somavarapu1, I., Bhaskar R., Prasad, N. (2015). A study on plant latex, a rich source of Proteases and cutting edge for disease invasion. *World J. Pharm. Res.*, 4,12, 1696-1711.
267. Pe, M., Bankovic, J., Aljancic, I.S., Todorovi, N.M., Jadrinin, M., Vajs, V.E., Teevi, V.V., Vukovi, I., Momilovic, M., Markovic, I.D., Tani, N., Rucdijic, S. (2011). New anti-cancer characteristics of jatrophone diterpenes from *Euphorbia dendroides*, *Food Chem. Toxicol.*, 49, 12, 3165-3173.
268. Jadrinin, M., Pecic, M., Aljancic, I.S., Milosavljevic, S.M., Todorovic, N.M., Podolski-Renic, A., Bankovic, J., Tanic, N., Markovic, I., Vajs, V.E., Tecevic, V.V. (2013). Jatrophone diterpenoids from the latex of *Euphorbia dendroides* and their anti-P-glycoprotein activity in human multi-drug resistant cancer cell lines. *Phytochem*, 86, 208-217.
269. Muhammad, I., Gul, J., Saim, D., Nasrullah, S., Hina, F. (2013). Antimicrobial Activities of the Ethanol Extracts of *Mirabilis jalapa* L. and *Euphorbia dendroides*. *Int Jof Phytomed*, 5, 475-478.

270. Brunia, R, Muzzolia, M., Ballerob, M., Loib, M.C., Fantinc, G., Polid, F., Sacchettia, G. (2004). Tocopherols, fatty acids and sterols in seeds of four Sardinian wild *Euphorbia* species. *Fitoterapia*, 75, 50-61.
271. www.tela-botanica.org fiche eFlore de *Euphorbia terracina*. page consultée le 21 novembre 2014.
272. Sarah Reichard and Lizbeth Seebacher, “*Euphorbia terracina* L., 2009.
273. <http://perso.wanadoo.fr/philippe.julve/catminat.htm>. Version : 06 janvier 2014
274. Abdallah, Emad M. (2015). Antimicrobial Properties and Phytochemical Constituents of the Metha- Nol Extracts of *Euphorbia Retusa Forssk* and *Euphorbia Terracina* L. from Saudi Arabia. *South Asian. J. Exp. Biol.*, 4 (2).
275. Mahmoud, Z.F, Abdel Salam, N.A. (1979). coumarins of *Euphorbia terracina* and *Euphorbia paralias* growing in Egypt. *pharmazie*, 34(7), 446-447.
276. Marco, J.A., Sanz-Cervera, J.F., Yuste, A., Jakupovic, J. (1999). Isoterracinolides A a Novel bishomoditerpene lactones from *Euphorbia terracina*. *J. Nat. Prod.*, 62, 110-113.
277. Wu, Q., Yu-ping, T., An-wei, D., Fen-qiang, Y., Li, Z., Jin-ao, D. (2009). ¹³C-NMR Data of Three Important Diterpenes Isolated from *Euphorbia* Species. *Molecules*, 14: 4454–75.
278. El-Menshawi, B.S., Fayad, K., Mahmoud, S.M., El-Hallouty, M., El-Manawaty, M.H., Olofsson, et al. (2010). Screening of natural products for therapeutic activity against solid tumors. *Indian J. Exp Biol*, 48(3): 258-64.
279. Djilani, A., Dicko, A., Younos, C., Bayoud, B., Legseir, B., Soulimani, R. (2006). Antibacterial Activity of Some Toxic Plants of Algerian Flora Growing in El-Kala National Park. *Nat. Prod.*, II 18. 35-39.
280. Harborne, B. (1984). Phytochemical Methods. In: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis, 2nd ed., pp. 4-6, Chapman and Hall, London.
281. Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of *Folin Ciocalteu* reagent. *Meth. in Enzym.*, 299:152-178.
282. Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, M., Ribéreau-Gayon, P., Sudraud P. (1972). Sciences et techniques du vin. Tome 1, analyse et controle des vins. Ed. Dunod, Paris, p. 671.
283. Chun, O.K., Kim, D.O., Moon, H.Y., Kang, H. G., Lee, C. Y. (2003). Contribution of Individual Polyphenolics to Total Antioxidant Capacity of Plums. *J. Agric. Food Chem.*, 51(25): 7240-7245.
284. Sun, B., Ricardo-da-Silva, J.M. (1998). Spranger, I. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins, *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4267-4274.
285. Schofield, P., Mbugua, D.M., Pell, A.N., 2001. Analyses of condensed tannins. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 91, 21-40.
286. Kuksis, A., Kovacevic, N., Lau, D., Vranic, M. (1975). Turnover of plasma oleic acid measured by radio-gas chromatography. *Fed. Proc.*, 34, 2238-2241.
287. Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn. J. Sci. Technol.*, 26 (2), 211.
288. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Fre. Rad. Bio. Med.*, 26(9-10), 1231-1237.
289. Prieto, P., Pineda, M., Aguillar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem.*, 269, 337-341.

290. Parekh, J., Chanda, S.V. (2007). *In vitro* antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plant, *Turk. J. Biol.*, 31(1), 53- 58.
291. Rota, M.C., Herrera, A., Martinez, R.M., Sotomayor, J.A., Jordan, MJ. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris* essential oils, *Food Cont.*, 19(7), 681-687.
292. Duraffourd, C., Lapraz. (2002). *Traité de phytothérapie clinique. Endobiogène et médecine.* Edition Masson, Paris.

ANNEXES

Annexe 1 : Analyse des extraits de l'*Euphorbia biumbellata* LC-MS

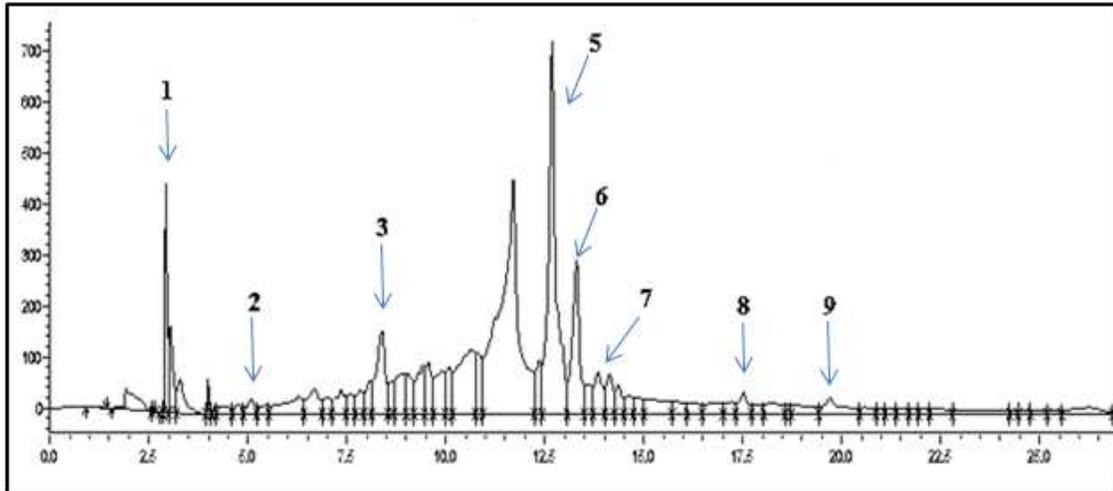


Figure 1: Chromatogramme de l'extrait des feuilles de l'*Euphorbia biumbellata* à 280 nm.
 1:acide ascorbique ; 2: acide gallique ; 3: acide chlorogénique ; 5: rutine ; 6: acide ellagique ;
 7: acide furelique ; 8: colchicine ; 9: quercitine.

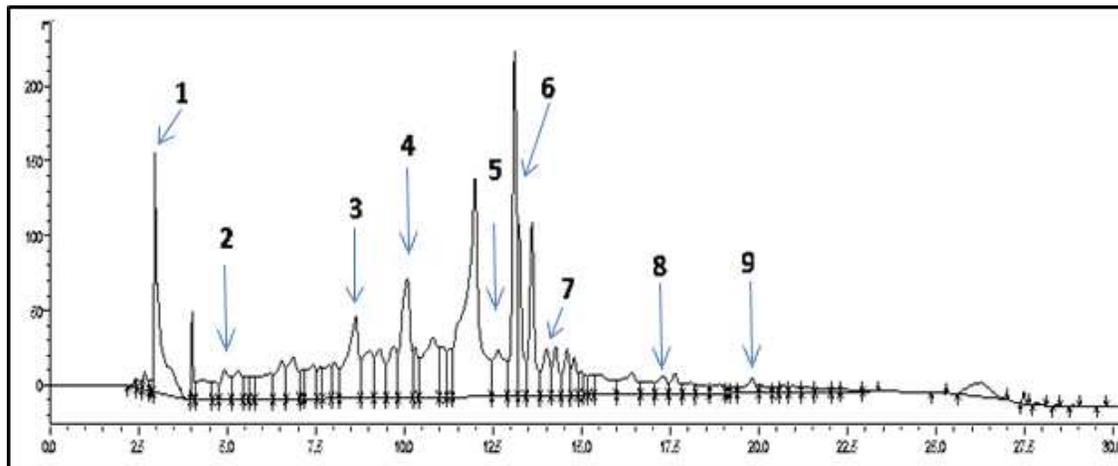


Figure 2: Chromatogramme de l'extrait des graines de l'*Euphorbia Biumbelatta* à 280 nm.
 1: acide ascorbique ; 2: acide gallique ; 3: acide chlorogénique ; 4: acide syringique ; 5: rutine ;
 6: acide ellagique ; 7: acide furelique ; 8: colchicine ; 9: quercitine.

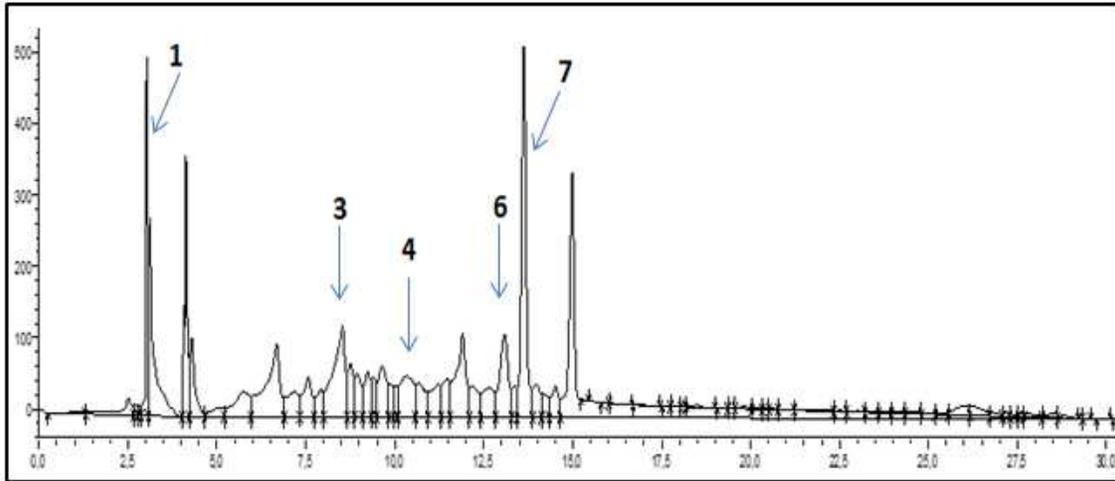
Annexe 2 Analyse des extraits de l'*Euphorbia dendroides* par LC-MS

Figure 1: Chromatogramme de l'extrait des feuilles de l'*Euphorbia dendroides* à 280 nm.
1: acide ascorbique ; 3: acide chlorogénique ; 4: acide syringique ; 6: acide ellagique ; 7: acide furelique.

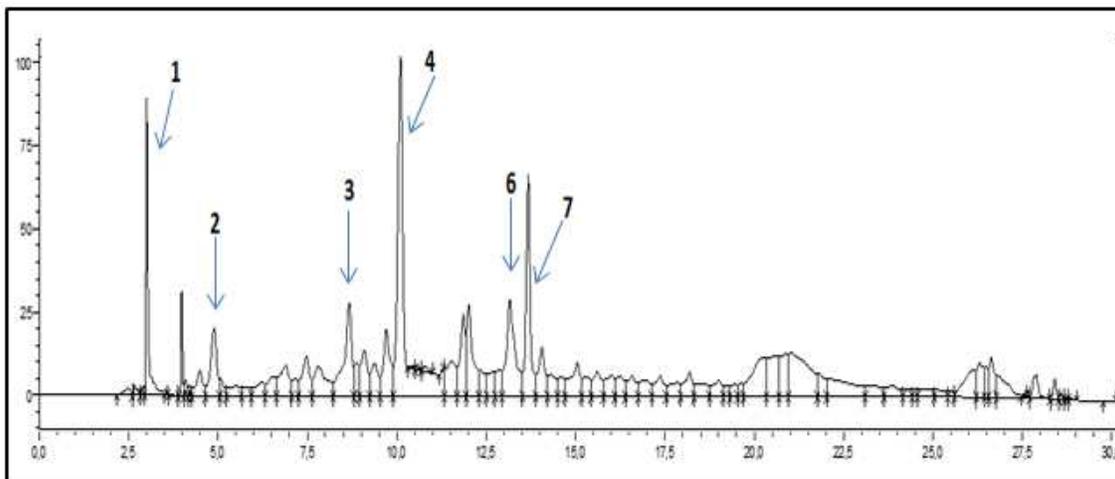


Figure 2: Chromatogramme de l'extrait des graines de l'*Euphorbia Dendroides* à 280 nm.
1: acide ascorbique ; 2: acide gallique ; 3: acide chlorogénique ; 4: acide syringique ; 6: acide ellagique ; 7: acide furelique.

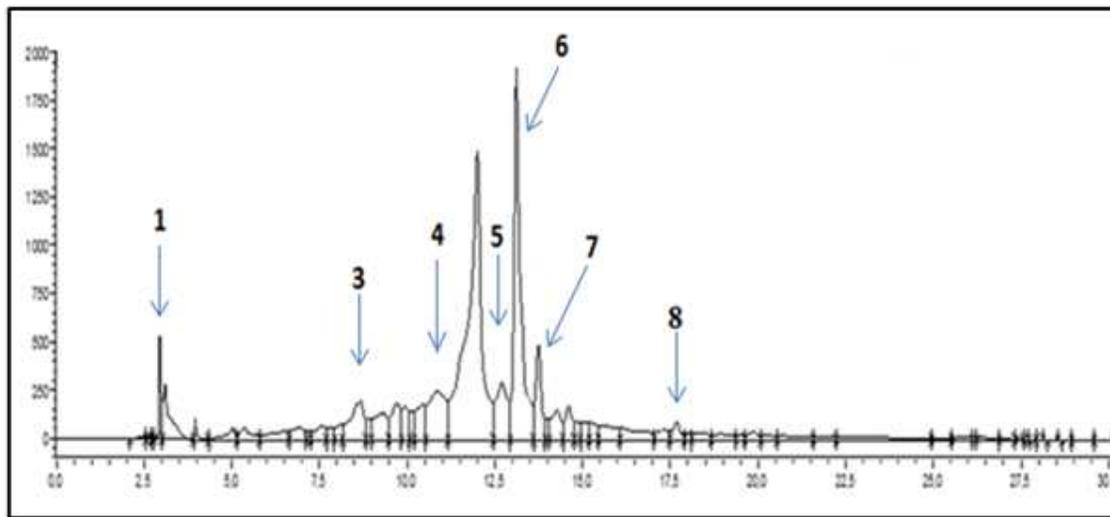
Annexe 3 : Analyse des extraits de l'*Euphorbia terracina* par LC-MS

Figure 1: Chromatogramme de l'extrait des feuilles de l'*Euphorbia terracina* à 280 nm.

1: acide ascorbique ; 3: acide chlorogénique ; 4: acide syringique ; 5: rutine ; 6: acide ellagique ; 7: acide furelique ; 8: colchicine.

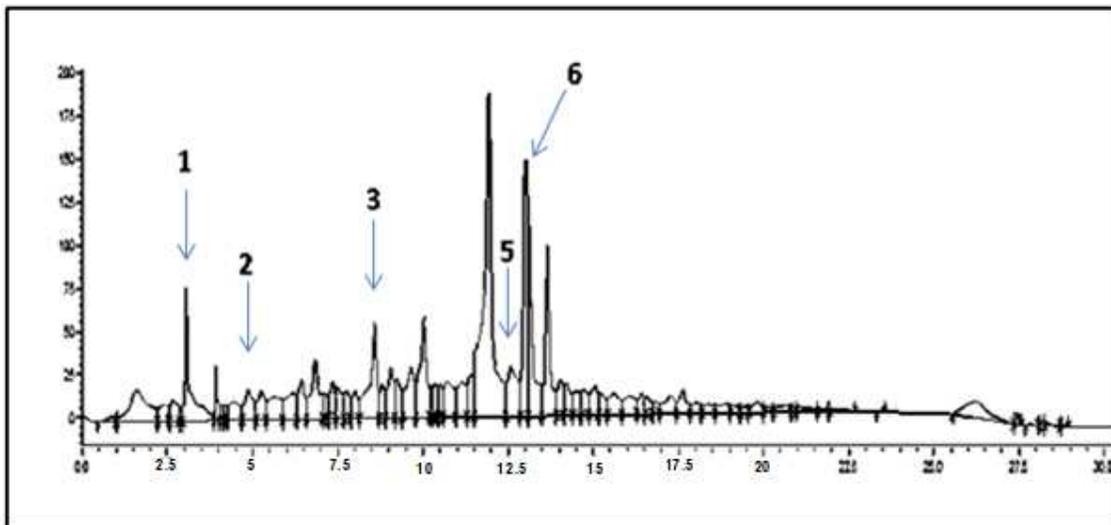


Figure 2: Chromatogramme de l'extrait des graines de l'*Euphorbia terracina* à 280 nm.

1: acide ascorbique ; 2: acide gallique ; 3: acide chlorogénique ; 5: rutine ; 6: acide ellagique.