

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE MOHAMED KHIDER BISKRA



FACULTE DES SCIENCES EXACTES, SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DES SCIENCES AGRONOMIQUES

Thèse

Présentée en vue de l'obtention du diplôme

de Doctorat en Sciences Agronomiques

Présentée par:

M<sup>lle</sup> Selwa LAHMADI

Thème

**Composition phénolique, activité antioxydante et  
biologique des extraits d'*Euphorbia granulata*  
Forssk. et *Euphorbia retusa* Forssk.**

**Membres de jury:**

<b>Directeur de Thèse:</b> Mr. Mohammed BELHAMRA	Professeur	C.R.S.T.R.A
<b>Président:</b> Mr. Djamel BARKAT	Professeur	Université de Biskra
<b>Examineur :</b> Mr. Abdelkrim Si BACHIR	Professeur	Université de Batna
<b>Examineur :</b> Mr. Tarek BENMEDDOUR	MCA	Université de Biskra
<b>Examineur:</b> Mr. Atef CHOUIKH	MCA	Université d'El Oued

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2020/2021.

## **DEDICACE**

*A mes chers parents*

*A madame Lakhdari Fattoum*

*A Monsieur le professeur Abdelguerfi Aissa*

*A ma famille*

**Je dédie ce travail**

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été conduit dans le Laboratoire de Phytochimie du Centre de Recherche Scientifique et Technique sur les Régions Arides Omar El- Barnaoui, Biskra, Algérie (**CRSTRA**), le Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie du Centre de Recherche en Biotechnologies de Constantine, Algérie (**CRBT**) et le Laboratoire des Plantes Extrêmophiles (LPE) du Centre de Biotechnologie de Borj-cédriae, Tunisie (**CBBC**).

Ce travail est encadré par le défunt **Professeur Mohamed BELHAMRA**, mon enseignant à l'université et mon directeur au CRSTRA que nous l'avons perdue le 6 juillet 2020 avec une profonde tristesse, que Dieu l'accueille dans son vaste paradis. Le professeur m'a prodigué tout au long de ce travail et qu'Allah récompense sa patience et ses précieux conseils, ses encouragements et ses orientations.

Mes remerciements vont à:

**Mr Djamel BARKAT** Professeur au département de la chimie industrielle à l'université de Biskra, pour m'avoir infiniment honorée en acceptant de consacrer un peu de son temps pour juger ce mémoire et d'assurer la présidence du jury en dépit de ses charges multiples.

Mes vifs remerciements aux membres de jury qui ont accepté de juger ce travail: à **Mr Abdelkrim Si BACHIR** Professeur à la Faculté des Sciences de la vie et de la nature de Batna, à **Mr Tarek BENMEDDOUR** Maître de Conférences (A) à l'université de Biskra et à **Mr Atef CHOUIKH** Maître de Conférences (A) à l'université d'El Oued d'avoir accepté d'examiner le travail.

Mes sincères remerciements à Madame **LAKHDARI F** et à Madame **Tabouche N**.

Je tiens aussi à remercier **Mr Kechbar M** et **M<sup>e</sup> Karoune S** pour ses encouragements, leur coopération durant tout le travail.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Monsieur **Bensouici C** chef de Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie pour son aide opulente et également les membres du laboratoire notamment **Imad, Lynda, Latifa, Hasna et Amina**.

Ce travail a bénéficié du soutien de plusieurs personnes, qu'elles trouvent ici mes sincères remerciements en particulier : Mesnoui M, Mawahib, Abdelhamide F, Wahiba M, Khalila B, Halima M, Samir B, Massaoud R, Zine eddine Bet Fateh B.

Merci pour tous ceux qui ont participé à la réussite de ce mémoire.

# Sommaire

## Liste des abréviations

## Liste des tableaux

## Liste des figures

Introduction générale .....	1
<b>Chapitre I. Étude bibliographique .....</b>	<b>4</b>
1. Présentation de la famille des Euphorbiacées.....	4
1.1. Position systématique.....	4
1.2. Utilisation d'Euphorbiaceae .....	5
1.2.1. Des plantes d'intérêt économique .....	5
1.2.2. Des plantes d'intérêt alimentaire.....	5
1.2.3. Des plantes d'intérêt ornementale.....	5
1.2.4. Des plantes d'intérêt médicinal .....	6
1.3. Chimie des Euphorbiaceae .....	6
1.4. Toxicité des Euphorbiaceae .....	6
1.5. Le genre <i>Euphorbia</i> .....	6
1.5.1. Propriétés pharmacologiques du genre <i>Euphorbia</i> .....	7
1.5.2. Chimie du genre <i>Euphorbia</i> .....	8
1.5.3. Etudes phytochimiques antérieurs sur le genre <i>Euphorbia</i> .....	8
2. Les espèces étudiées.....	10
2.1. <i>Euphorbia retusa</i> Forssk, Synonyme : <i>E. cornuta</i> Persoon (Le Floc'h et al., 2010)	10
2.2. <i>Euphorbia granulata</i> Forssk. Variété genuina. ....	10
3. Les radicaux libres .....	12
3.1. Le stress oxydant et les radicaux libres .....	12
3.2. Principaux radicaux libres .....	12
3.3. Les moyens de défense contre les radicaux libres .....	12
4. Les composés phénoliques .....	13
4.1. Biosynthèse des composés phénoliques .....	14
4.2. Principales classes des composés phénoliques.....	14
4.2.1. Les formes les plus simples.....	15
4.2.2. Les formes condensées .....	19

4.3. Principales potentialités biologiques des composés phénoliques .....	21
4.3.1. Activité antioxydante .....	21
4.3.2. Activité antivirale.....	24
4.3.3. Activité anti-inflammatoire .....	24
4.3.4. Activité anticancéreuse .....	24
4.3.5. Activité photoprotective .....	25
4.3.6. Autres activités biologiques .....	26
4.4. L'extraction des polyphénols par les solvants .....	26
4.4.1. Extraction.....	26
4.4.2. Les solvants d'extraction .....	27
4.5. Quantification, séparation et identification des polyphénols.....	28
4.5.1. Technique spectrophotométrique .....	28
4.5.2. Technique chromatographique .....	29
<b>Chapitre II. Matériel et méthodes .....</b>	<b>30</b>
1. Matériel végétal.....	33
2. Caractérisation du site de collecte.....	33
3. Collecte et préparation des échantillons .....	35
4. Préparation des extraits.....	35
5. Analyse phytochimiques .....	36
5.1. Dosage des composés phénoliques .....	36
5.1.1. Polyphénols totaux .....	36
5.1.2. Flavonoïdes totaux.....	37
5.2. Les activités antioxydantes.....	38
5.2.1. Piégeage du radical DPPH .....	38
5.2.3. Piégeage du radical-cation ABTS <sup>•+</sup> .....	38
5.2.4. Test de l'activité de métal chélation .....	39
5.2.3. Test de blanchissement du $\beta$ -carotène.....	40
5.2.4. Le pouvoir réducteur de l'ion ferrique .....	41
5.2.5. La réduction cuprique (Cupric reducing antioxidant capacity: CUPRAC) .....	41
5.3. Facteur de protection solaire : Sun protection factor (SPF) .....	42
5.4. La chromatographie à haute performance en phase liquide (CLHP) .....	42
6. Traitement des données statistiques.....	43
<b>Chapitre III. Résultats .....</b>	<b>45</b>

1. Variations des teneurs en composés phénoliques et des activités antioxydantes	
d' <i>E. granulata</i> .....	46
1.1. Détermination des composés phénoliques .....	46
1.1.1. Teneur en polyphénols totaux .....	46
1.1.2. Teneur en flavonoïdes totaux .....	46
1.2. Evaluation du potentiel antioxydant des composés phénoliques .....	47
1.2.1. Activité antiradicalaire .....	47
1.2.2. Piégeage du radical-cation ABTS <sup>•+</sup> .....	47
1.2.3. Activité de métal chélation.....	48
1.2.4. Pouvoir réducteur du fer .....	51
1.2.5. L'activité antioxydante par la réduction du cuivre (CUPRAC) .....	51
1.3. Caractérisation phytochimique par Chromatographie liquide à haute performance (CLHP) .....	53
2. Variations des teneurs en composés phénoliques, des activités antioxydantes et photoprotectives des organes d' <i>Euphorbia retusa</i> .....	55
2.1. Détermination des composés phénoliques .....	55
2.1.1. Teneur en polyphénols totaux .....	55
2.1.2. Teneur en flavonoïdes totaux .....	56
2.2. Evaluation du potentiel antioxydant des composés phénoliques .....	57
2.2.1. Activité antiradicalaire .....	57
2.2.2. Piégeage du radical-cation ABTS <sup>•+</sup> .....	60
2.2.3. Activité inhibitrice du blanchiment de la $\beta$ -carotène .....	63
2.2.4. Pouvoir réducteur du fer .....	65
2.2.5. L'activité antioxydante par la réduction du cuivre (CUPRAC) .....	68
2.3. Evaluation de l'activité photoprotective par le facteur de protection solaire (FPS) .....	70
2.4. Caractérisation phytochimique par Chromatographie liquide à haute performance (CLHP) .....	70
<b>Chapitre IV. Discussion .....</b>	<b>64</b>
1. Variations des teneurs en composés phénoliques et des activités antioxydantes d' <i>E. granulata</i> .....	74
1.1. Les composés phénoliques .....	74
1.2. Le potentiel antioxydant des composés phénoliques .....	75
1.3. Caractérisation phytochimique par Chromatographie liquide à haute performance (CLHP) .....	76

2. Variations des teneurs en composés phénoliques, des activités antioxydantes et photoprotectives d' <i>Euphorbia retusa</i> . .....	77
2.1.Teneurs en composés phénoliques.....	77
2.2.Le potentiel antioxydant des composés phénoliques.....	79
2.3.Evaluation de l'activité photoprotective par le facteur de protection solaire (FPS) .....	81
2.4..Caractérisation phytochimique par Chromatographie liquide à haute performance (CLHP) .....	83
<b>Conclusion générale et perspectives .....</b>	<b>85</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>88</b>

Annexe

Valorisation des résultats de la thèse

Résumé

## Liste des abréviations

[C] : Concentrations

$A_{0.50}$  ( $\mu\text{g} / \text{ml}$ ): Correspondant à la concentration indiquant l'absorbance 0.50

ABTS: Sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis- (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique

ABTS<sup>++</sup>: Sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzoline)n – 6sulfonique.

APG: Angiosperm Phylogeny Group

BHA: Butylated hydroxyanisole

BHT: Butylated hydroxytoluene

CAM: Crassulacean Acid Metabolism

CCM: Chromatographie sur Couche Mince

CI<sub>50</sub> ( $\mu\text{g} / \text{ml}$ ): La concentration d'inhibiteur (antioxydant) nécessaire pour diminuer 50 % du taux des radicaux libres.

CLHP-DAD: High-performance liquid chromatography- Détecteur à barrette diodes

CRBT: Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine.

CRSTRA : Centre de Recherche Scientifique et Technique sur les Régions Arides de Biskra

CUPRAC: Cuivrique Réduire Antioxydant Capacity

DAD: Diode Array Detector

DO extrait: Absorbance de la solution d'extrait.

DO témoin: Absorbance du témoin.

DPPH: 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl

DS : Déviation standards

EAG: Equivalent d'acide gallique

EC: L'électrophorèse capillaire

EDTA: Éthylène diaminetétra acétique

EQ: Equivalent de la quercétine

ERO: Espèces réactives de l'oxygène



ES : Extrait sec

FPS: Facteur de protection solaire

GPxs: Les glutathion peroxydases

HORAC: Assay Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity

HPLC: Chromatographie Liquide à Haute Performance

HRMS: La spectrométrie de masse à haute résolution

IC<sub>50</sub>: La concentration d'inhibiteur (antioxydant) nécessaire pour diminuer 50 % du taux des radicaux libres

INRF: Institut National de la Recherche forestière d'Algérie

MS/MS ou MS<sup>n</sup> : La spectrométrie de masse en tandem.

MS: La spectrométrie de masse

PI%: Pourcentage d'inhibition

RMN: La résonance magnétique nucléaire

RMN: Spectromètre de résonance magnétique nucléaire

ROS : Reactive oxygen species

SD : Standard deviation

SOD: Les superoxydes dismutases

TCA: Acide trichloracétique

TRAP: Total radical-trapping antioxidant parameter

UV: Ultraviolet

UVA: Les UVA correspondent à une longueur d'ondes de 400 à 315 nm.

UVB: Les UVB à une longueur d'ondes de 315 à 280 nm.

Variance: ANOVA one-way

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01:</b> Usages et propriétés de quelques espèces du genre <i>Euphorbia</i> .....	7
<b>Tableau 02:</b> Composition phytochimique de quelques espèces d' <i>Euphorbia</i> .....	9
<b>Tableau 03:</b> Les différentes catégories de protection solaire (Schalka et Reis, 2011).....	25
<b>Tableau 04:</b> Relation entre le FPS et la protection contre les UVB (Brunet, 2014).....	26
<b>Tableau 05:</b> Teneurs en polyphénols totaux (exprimées en µg EAG/ mg ES) et en flavonoïdes (exprimées en µg EQ/ mg ES) dans les extraits secs de la partie aérienne d' <i>E. granulata</i> .....	46
<b>Tableau 06:</b> Activité antioxydante contre le radical DPPH <sup>•</sup> , le radical ABTS <sup>•</sup> , et les ions chélates exprimée en CI <sub>50</sub> (µg /ml) des extraits secs de la partie aérienne d' <i>E. granulata</i> (Les concentrations testés entre 3.125 µg et 200 µg /ml).....	48
<b>Tableau 07:</b> Activité antioxydante contre le radical DPPH <sup>•</sup> et le radical ABTS <sup>•</sup> exprimé en CI <sub>50</sub> (µg /ml) de l'extrait méthanolique sec de la partie aérienne d' <i>E. granulata</i> . (Les concentrations entre 1.5625 et 100 µg /ml).....	49
<b>Tableau 08:</b> L'activité antioxydante par le pouvoir réducteur du fer et la réduction du cuivre (CUPRAC) exprimée en A <sub>0.50</sub> (µg/ml) des extraits secs de la partie aérienne d' <i>E. granulata</i> .....	51
<b>Tableau 09:</b> Teneurs en polyphénols totaux (exprimées en µg EAG/ mg ES) dans les extraits secs des organes d' <i>E. retusa</i> .....	56
<b>Tableau 10:</b> Teneur en flavonoïdes totaux (exprimées en µg EQ/mg ES) dans les extraits secs des organes d' <i>E. retusa</i> .....	57
.....	58
<b>Tableau 11:</b> Activité contre le radical DPPH exprimée en CI <sub>50</sub> µg /ml des extraits secs des organes d' <i>E. retusa</i> ....	58
<b>Tableau 11</b> Activité antiradicalaire (test ABTS <sup>•+</sup> ) exprimée en CI <sub>50</sub> (µg/ml), des extraits secs des organes d' <i>E. retusa</i> .....	58
<b>Tableau 13:</b> Activité inhibitrice du blanchiment de la β-carotène exprimée en CI <sub>50</sub> (µg/ml), des extraits secs des organes d' <i>E. retusa</i> .....	63
<b>Tableau 14:</b> Pouvoir réducteur du fer, exprimé en A <sub>0.50</sub> µg/ml des extraits secs des organes d' <i>E. retusa</i> .....	66

<b>Tableau 15:</b> Activité antioxydante de la réduction du CUPRAC exprimée en $A_{0.50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ ), des extraits secs des organes d' <i>E. retusa</i> .....	68
<b>Tableau 16:</b> Les valeurs moyennes de l'FPS des extraits secs d' <i>E. retusa</i> .....	70

## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b> <i>Euphorbia retusa</i> . a : Plante entière, b : ramification, c : capsules, d : graines. (Photo originale).....	11
<b>Figure 2 :</b> <i>Euphorbia granulata</i> . a : Plante entière, b : ramification, c : capsules, d : cyathe (Photo originale).....	11
<b>Figure 3 :</b> Aperçu des différentes espèces réactives de l'oxygène ERO et des antioxydants régulateurs de leur production (Haleng et al., 2007).....	13
<b>Figure 4 :</b> La voie du shikimate est au centre de synthèse de divers métabolites primaires et secondaires. PAL=phénylalanine ammonialyase. CS=chalcone synthase (Hopkins, 2003)...	14
<b>Figure 5 :</b> Acides hydroxybenzoïques (Macheix et al., 2005).....	15
<b>Figure 6 :</b> Acides hydroxycinnamiques (phénylpropanoïdes) (Macheix et al., 2005).....	16
<b>Figure 7 :</b> Les principales coumarines (Macheix et al., 2005).....	16
<b>Figure 8 :</b> Structures de l'enchaînement benzo- $\gamma$ -pyrone (Ghedira, 2005).....	18
<b>Figure 9 :</b> Le penta-galloylglucose (Macheix et al., 2005).....	20
<b>Figure 10 :</b> Le penta-galloylglucose (Macheix et al., 2005).....	20
<b>Figure 11 :</b> Les trois monolignols dérivés des acides hydroxycinnamique (Hopkins, 2005)..	21
<b>Figure 12 :</b> Diagramme de préparation des échantillons et d'extraction des composés phénoliques par les solvants.....	21
<b>Figure 13 :</b> Diagramme des analyses phytochimiques effectuées .....	31
<b>Figure 14 :</b> Situation géographique de la plaine d'El-Outaya.....	34
<b>Figure 15 :</b> Photo d'un appareil de Soxhlet.....	35
<b>Figure 16 :</b> Profils des pourcentages d'inhibitions des activités antioxydantes; a et b : Activité antiradicalaire (test DPPH), c et d: activité antiradicalaire (test ABTS <sup>+</sup> ), e : Activité du métal chélate des extraits secs de la partie aérienne d' <i>E. granulata</i> et des standards utilisés. BHA: butylatedhydroxyl anisole BHT: butylated hydroxytoluene. EDTA: Éthylènediaminetétraacétique.....	50
<b>Figure 17 :</b> Profils d'absorbance du pouvoir réducteur du fer (g) et de la réduction du cuivre (CUPRAC) (h) des extraits secs de la partie d' <i>E. granulata</i> et des standards utilisés.....	52
<b>Figure 18:</b> Chromatographique obtenu à 280 nm d'extrait méthanolique de la partie aérienne d' <i>E. granulata</i> (E), mélange de standards (F). Les numéros des pics correspondent à :1- Acide gallique, 2- Resorcinol., 3- Acide Caféique, 4- acide p-coumarique, 5- Rutine, 6-Acide rosmarinique, 7- isorhamnetin-3-o-glucoside, kaempférol3-orutinoside.....	54

**Figure 19:** Profils de l'activité antiradicalaire (test DPPH<sup>\*</sup>) des extraits secs des organes d'*E. retusa* et des standards utilisés. a : les graines ; b : les capsules ; c : les feuilles ; d : les tiges ; e : les racines. BHA: butylatedhydroxyl anisole ; BHT : butylated hydroxytoluene.....59

**Figure 20 :** Profils de l'activité antiradicalaire (test ABTS<sup>++</sup>) des extraits secs des organes d'*E. retusa* et des standards utilisés. a : les graines; b : les capsules; c : les feuilles; d : les tiges; e : les racines. BHA: butylatedhydroxyl anisole ; BHT : butylated hydroxytoluene.....62

**Figure 21 :** Profils de l'activité inhibitrice du blanchiment de la  $\beta$ -carotène des extraits secs des organes d'*E. retusa* et des standards utilisés. a : les graine ; b : les capsules ; c : les feuilles ; d : les tiges ; e : les racines. BHA: butylatedhydroxyl anisole ; BHT : butylated hydroxytoluene.....64

**Figure 22 :** Profils des absorbances du pouvoir réducteur du fer des extraits secs des organes d'*E. retusa* et des standards utilisés. a : les graine; b : les capsules; c : les feuilles; d : les tiges ; e : les racines. BHA: butylatedhydroxyl anisole BHT : butylated hydroxytoluene.....67

**Figure 23 :** Profils de l'absorbance du CUPRAC des extraits secs des organes d'*E. retusa* et des standards utilisés. a : les graine ; b : les capsules ; c : les feuilles ; d : les tiges ; e : les racines. BHA: butylatedhydroxyl anisole BHT : butylated hydroxytoluene.....69

**Figure 24 :** Profil chromatographique enregistré à 280 nm des principaux composés phénoliques d'extrait méthanolique des fruits d'*E. retusa* (C), mélange de standards (D). Les numéros des pics correspondent à:1- le catéchine hydraté, 2- Epigallocatechin 3-o- Gallate, 2- Acide syringique, 4- acid sinapique, R-Quercetine.....71

**Figure 25 :** Profil chromatographique enregistré à 280 nm des principaux composés phénoliques d'extrait méthanolique des graines d'*E. retusa* (A), mélange de standards (B). Les numéros des pics correspondent à:1- Epigallocatechin 3-O- Gallate, 2- Epicatechin3-Ogallate, 3-acide syringique, 4- acid sinapicque , 4-Quercetine.....72

### Introduction générale

En régions arides et sahariennes, la flore constitue une diversité importante. Cette végétation développe une stratégie de résistance aux conditions environnementales extrêmes de son habitat, telles que les températures élevées, la salinité, la sécheresse et les intensités lumineuses élevées. Par ailleurs, chez les être vivant, les conditions environnementales hostiles conduisent à la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou bien (ROS) « reactive oxygen species » l'origine du stress oxydatif qui provoque des dommages physiologiques et biochimiques (Ksouri et *al.*, 2009). En effet, les plantes réagissent au stress environnemental pour résister et éliminer les ROS toxiques en développant des mécanismes biochimiques de détoxification des ROS à l'aide des substances naturelles de nature enzymatique et non enzymatique. Ces dernières substances comme les composés phénoliques, le glutathion, les caroténoïdes et les vitamines (Parvaiz et *al.*, 2009) joue un rôle antioxydant primordiale.

Aujourd'hui, la recherche sur les nouvelles sources de substances naturelles d'intérêt biologique y compris antioxydantes constitue un enjeu de taille dans le domaine de la course des industries pharmaceutiques, cosmétologiques et agroalimentaire nécessaires (ksouri et *al.*, 2009).

Par ailleurs, les polyphénols sont très connus par leur pouvoir antioxydant. Ces composés présentent aussi un large éventail de propriétés biologiques notamment, anti-inflammatoire, antiulcéreux, anticancéreux, antibactériens (ksouri et *al.*, 2008). Ainsi, la teneur des polyphénols et leur pouvoir antioxydant chez les végétaux est corrélé positivement avec le stress environnemental. Cette corrélation a montré par de nombreuses études notamment chez l'espèce *Mesembryanthemum edule* sous stress salin (Falleh et *al.*, 2012 a) et l'espèce *Solanum lycopersicum* sous stress hydrique (Rivero et *al.*, 2001). En effet, ces substances naturelles peuvent se retrouver couramment chez les plantes sahariennes qui se caractérisent par des propriétés biologiques importantes (Trabelsi et *al.*, 2010; Gasmi et *al.*, 2019). D'autre part, les connaissances ethnobotaniques reconnues depuis un fort long temps peuvent être utilisées comme un outil efficace pour faciliter la recherche sur les substances naturelles.

Parmi les espèces utilisées en médecine traditionnelle au Sahara: *Euphorbia granulata* Forssk et *Euphorbia retusa* Forssk.

*Euphorbia granulata* est une plante fourragère, utilisée traditionnellement au Sahara algérien pour guérir les morsures des serpents venimeux et des scorpions (Sahki et Sahki Boutamine, 2004). Les études réalisées sur *Euphorbia granulata* ont montré leurs propriétés diurétiques, antifongiques et antibactériennes (Saleem et al., 2015 ; Ahmad et al., 2012 ; Awaad et al., 2017). En outre, le seul travail effectué sur *E. granulata* qui pousse en Algérie est celui de Bousselessela et al. (2012). Son travail contribue à évaluer les activités antioxydantes et antibactériennes des extraits des alcaloïdes et des terpènes de cette plante.

D'autre part, *Euphorbia retusa* Forssk (synonym: *E. cornuta* Persoon.) est utilisé comme un remède efficace contre l'eczéma infantile et le trichiasis dans le Sahara algérien et tunisien (Hammiche et et Maiza, 2006; Sdayria et al., 2019). En Arabie Saoudite, *E. retusa* est utilisé comme un anti-asthmatique et un antitussif (Abdallah, 2014).

Récemment, les études réalisées sur l'espèce *E. retusa* évaluent la teneur en polyphénols et en flavonoïde totaux avec l'identification et l'isolation des composés phénoliques de la partie aérienne de cette plante qui pousse en Egypte (Ghareeb et al., 2018), une autre étude a été réalisée par Sdayria et al. (2019) et qui détermine l'activité antioxydante, analgésique, et anti-inflammatoire avec l'identification des composés phénoliques des feuilles d'*E. retusa* qui pousse en Tunisie. Par contre, la composition phytochimique d'*E. retusa* du Sahara algérien a été étudiée uniquement sur les terpénoïdes (Haba et al., 2009).

Les difficultés liées au matériel biologique sont à l'origine du manque de données scientifiques, c'est la raison pour laquelle nous nous sommes penchés sur l'étude de la composition phénolique et les activités antioxydantes d'*E. granulata* et d'*E. retusa*.

Donc, l'objectif général est d'apporter un fondement scientifique à l'origine des utilisations traditionnelles et des connaissances associées. Alors que, les objectifs spécifiques sont de faire des études expérimentales *in vitro* sur ces deux espèces trouvées dans la plaine d'El Outaya. (Région des Ziban) à fin d'évaluer la teneur en polyphénols totaux, en flavonoïdes et les potentialités antioxydantes des extraits phénoliques de la partie aérienne d'*E. granulata* et de 5 organes d'*E. retusa* (racines, tiges, feuilles, capsules et graines). En plus, la

détermination de l'activité photoprotective des organes d'*E. retusa* par le facteur de protection solaire (FPS) a été aussi évaluée.

D'autre part, l'extraction est effectuée par le soxhlet en utilisant séparément quatre solvants de polarité croissante (hexane, acétate d'éthyle, méthanol et eau distillée), dont les extraits d'hexane ne sont pas pris en considération dans cette étude. Pour cela l'évaluation de l'impact de la nature des extraits sur les activités testées est déterminée également. Finalement, une identification de certaines molécules phénoliques de quelques extraits se fait par HPLC-DAD.

Notre thèse est structurée en un quatre chapitres, un chapitre portant sur une synthèse bibliographique descriptive de notre thématique. La seconde partie décrit les démarches méthodologiques en abordant la préparation des échantillons, les protocoles expérimentaux des analyses phytochimiques effectuées. La partie résultats, présente les valeurs moyennes des analyses phytochimiques réalisés et même la présentation des profils chromatographiques des composantes phénoliques identifiées. La discussion a été faite par la comparaison des résultats obtenus avec des travaux similaires et la comparaison des résultats d'*E. granulata* avec ceux d'*E. retusa*.

En fin une conclusion présentant une synthèse des principaux résultats obtenu et à la lumière de ces résultats, nous essaierons de proposer quelques perspectives de recherche.



### Chapitre I. Étude bibliographique

Ce chapitre décrit les thématiques de notre travail notamment, la présentation de la famille des Euphorbiaceae y compris le genre *Euphorbia*, les espèces étudiées, les radicaux libres, les polyphénols (structures, propriétés, capacité biologique, extraction des polyphénols et les solvants d'extraction), ainsi les techniques spectrophotométriques de quantification, séparation et d'identification des polyphénols.

#### 1. Présentation de la famille des Euphorbiacées

La famille des Euphorbiaceae comprend plus de 300 genres, environ 8000 espèces (Bruneton, 2005; Frohne et *al.*, 2009). Cette famille est connue par une hétérogénéité morphologique importante qui rassemble à la fois de petites herbes jusqu'à de grands arbres, des lianes, des arbustes aphyllés et parfois même des espèces cactiformes adaptées à la vie désertique (Frohne et *al.*, 2009). De plus, les Euphorbiacées sont des végétaux CAM qui vivent principalement en régions arides et semi- arides ou sont épiphytes en région tropicale et subtropicale (Meyer et *al.*, 2004).

##### 1.1. Position systématique

La classification botanique est une discipline en perpétuelle évolution. La systématique classique établit par les auteurs ; Takhtajan russe, Cronquist et Thorne, botanistes américains, et Dahlgren, botaniste danois ne sont pas exactement les mêmes. La classification basée sur le traitement informatique des caractères morphologiques pour réaliser des arbres phénétiques ou phénogrammes est un outil faible aussi puisque elle établit des groupes basés sur des ressemblances. Ainsi, la méthode dit cladistique proposée par Willi Hennig vers 1950 ne bouleverse pas complètement la systématique classique. Actuellement, la systématique botanique s'appuie sur les travaux de l'APG (l'*Angiosperm Phylogeny Group*) sur les plantes à fleurs et sur les plantes sans fleurs (Reynaud, 2011).

Les modifications apportées aux différents systèmes de classifications ne l'étaient véritablement qu'en amont de l'ordre des Euphorbiaceae (Spichiger, 2004). Selon Dupont et

Guignard (2012), la classification APG3 montre que la famille des Euphorbiaceae appartenait à :

Embranchement : Spermaphytes

Sous-embranchement: Angiosperme

Classe: Fabidées

Ordre: Rosidées

Sous ordre: Malpighiales

Famille: Euphorbiaceae

### 1.2. Utilisation d'Euphorbiaceae

La famille des Euphorbiaceae offre des plantes de différents usages, notamment:

#### 1.2.1. Des plantes d'intérêt économique

Notamment, *Hevea brasiliensis* (l'arbre à caoutchouc) est la source principale de caoutchouc naturel. *Aleurites moluccana* (le noyer des Moluques) et *A. fordii* (l'aleurite) fournissent l'huile de tung et d'autres huiles utilisées dans l'industrie des peintures et vernis. L'espèce *Sapium sebiferum* (l'arbre à suif) fournit un suif et une cire végétale. L'espèce *Euphorbia* spp. (des euphorbes) fournissent des hydrocarbures semblables à ceux du pétrole (Judd et al., 2002). L'espèce *Ricinus communis* L. dont les graines fournissent une huile, matière première pour la synthèse de polymères et de surfactant.

#### 1.2.2. Des plantes d'intérêt alimentaire

Les racines tubéreuses de *Manihot esculenta* (manioc, cassava et yucca) sont une source importante d'amidon dans les régions tropicales. Les feuilles de *Cnidoscolus chayamansa* sont consommables et les fruits d'*Antidesma bunius* sont comestibles aussi (Judd et al., 2002).

#### 1.2.3. Des plantes d'intérêt ornementale

Certaines espèces sont ornementales comme *Euphorbia Jatropha*, *Euphorbia codiaeum* et *Euphorbia acalypha* (Judd et al., 2002).

### 1.2.4. Des plantes d'intérêt médicinal

D'autres espèces souvent utilisées dans les systèmes traditionnels de médecine comme *Phyllanthus fusco-luridus* Müll s'emploie contre la dysenterie et la diarrhée. L'espèce *Phyllanthus madagascariensis* Mull est un remède contre la syphilis (Decary, 1966).

### 1.3. Chimie des Euphorbiaceae

Les composés chimiques des espèces d'Euphorbiaceae sont variables on cite les alcaloïdes, di ou tri-terpènes, tannins et glucosides cyanogénétiques (Judd et al., 2002).

### 1.4. Toxicité des Euphorbiaceae

Un grand nombre d'espèces de cette famille sont dangereuses. Certaines sont urticantes (*Caperonia*, *Dalechampia*, *Platygyne*, *Tragia*, etc.), d'autres très toxiques : ce sont, majoritairement des Crotonoideae (*Aleurites*, *Croton*) (Bruneton, 2005). *Maprounea afriicana*, *Maprounea nzeinbranacea* et *Spondianthus preussii* possèdent des triterpènes tétracycliques très oxygénés de la série des Cucurbitacines. Ces substances sont très toxiques (Tessie et al., 1975). Les cardénolides chez les Euphorbiaceae sont des glycosides très toxiques d'un type de stéroïde à 23 carbones (Judd et al., 2002). En outre, Cette famille élaborent souvent du latex laiteux ou coloré; généralement toxiques.

### 1.5. Le genre *Euphorbia*

Le genre *Euphorbia* est le plus diversifié de la famille des Euphorbiaceae (Ozenda, 2004; Spichiger, 2004) et comprend de 2000 espèces (Judd et al., 2002; Tanveer et al. 2013). Ce vaste genre compte des espèces diversifiées morphologiquement ; annuelles, vivaces, herbacées, d'arbustes et de nombreuses plantes succulentes ressemblant, à première vue, à des cactées (Frohne et al., 2009).

D'après Quezel et Santa (1963) et Ozenda (2004) 17 espèces de ce genre sont trouvées en Algérie : *E. granulata* Forssk, *E. chamaesyce* L., *E. echinus* Hook fil. et Coss., *E. guyoniana* Boiss. et Reut., *E. calyptata* Cosson et DR., *E. retusa* Forssk., *E. dracunculoides* Lam. ssp. *flamandi* (Batt), *E. dracunculoides* Lam. ssp. *inconspicua* (Ball.), *E. dracunculoides* Lam. ssp. *glebulosa* (Cosson et DR.), *E. pubescens* Vahl., *E. peplus* L., *E. terracina* L., *E.*

*helioscopia* L., *E. sanguinea* Hochst. et steud., *E. atlantica* Coss., *E. akenocarpa* Guss., *E. nicaensis* All., *E. pithyusa* L., *E. paniculata* Desf.

### 1.5.1. Propriétés pharmacologiques du genre *Euphorbia*

Le genre *Euphorbia* est riche en propriétés pharmacologiques, le tableau 1 présente certaines usages et propriétés pharmacologiques de quelques espèces de ce genre.

**Tableau 1. Usages et propriétés de quelques espèces du genre *Euphorbia***

Espèce	Usages et propriétés	Références
<i>Euphorbia granulata</i> Forssk.	Effet antibactérien	(Awaad et al., 2017)
<i>Euphorbia helioscobia</i> L.	Effet antibactérien	(Awaad et al., 2017)
<i>Euphorbia hirta</i> Linn.	Effet antibactérien	(Awaad et al., 2017)
<i>Euphorbia hirta</i> Linn.	Effet antiplasmodique	(Ajayi et al., 2017)
<i>Euphorbia neriifolia</i> L.	Le latex d' <i>E. neriifolia</i> est utilisé comme laxatif, purgatif, rubéfiant, carminatif et expectorant. anti-arthrite, anti-cancérogène et antidiabétique.	(Prashant et Shital, 2017a)
<i>Euphorbia tirucalli</i> L.	Le latex de <i>E. tirucalli</i> est vésicant et rubéfiant qui est utilisé pour rhumatismes, verrues, toux, asthme, mal aux oreilles, mal aux dents et névralgies.	( Prashant et Shital, 2017b)
<i>Euphorbia retusa</i> Forssk.	Antibactérienne	(Abdallah, 2015) (Hammiche et Maiza, 2006)
<i>Euphorbia ebracteolata</i> Hayata.	Effet insecticide, elle est principalement utilisée pour traiter la scrofule.	(Wang et al., 2013)

### 1.5.2. Chimie du genre *Euphorbia*

Toutes les espèces d'*Euphorbia* possèdent un latex blanchâtre qui se caractérise par la présence de graines d'amidon de forme particulière, en bâtonnet, ce latex riche en tri-terpènes tétracycliques ou pentacycliques ; euphol, tirucallool, butyrospermol, euphorbol, corolladiol, lanostérol, lanosténol, cycloarténol, CH<sub>2</sub>-24 cycloartanol ( Frohne et *al.*, 2009).

### 1.5.3. Etudes phytochimiques antérieurs sur le genre *Euphorbia*

De nombreuses études phytochimiques et pharmacologiques font l'objet du genre *Euphorbia*. Particulièrement sur l'isolement et la caractérisation d'un grand nombre de métabolites secondaires (tableau 2).

Tableau 2. Composition phytochimique de quelques espèces d'*Euphorbia*

Classe phytochimique	Espèce	Constituants identifiés	Références
Flavonoïdes	<i>Euphorbia guyoniana</i> Boissier & Reuter	Quercetine-3O-β-D-glucuronide, kaempferol-3O-β-D-glucuronide	(Smara et al., 2014)
	<i>Euphorbia neriifolia</i> L.	Neriifoliol, Quercetin, Rutin et cycloartenol 2-(3,4-dihydroxy-5-méthoxyphényl) 3,5-dihydroxy-6,7-diméthoxychromène-4-one	(Prashant et Shital, 2017a) Sharma et Janmeda, 2017
Triterpenoids	<i>Euphorbia retusa</i> Forssk.	palmitate de multi fluorényle et 24 méthylène cycloartenol.	Haba et al., 2009
Acides Phénoliques	<i>Euphorbia hirta</i> L.	Acide syringique, acide chlorogénique et acide caféique	PiÓro-Jabrucka et al., 2011
Diterpènes	<i>Euphorbia lathyris</i>	Euphorbia factors L <sub>1</sub> -L <sub>3</sub> , L <sub>7a</sub> et L <sub>8</sub> .	Hou et al., 2011

### 2. Les espèces étudiées

#### 2.1. *Euphorbia retusa* Forssk, Synonyme : *E. cornuta* Persoon (Le Floc'h et al., 2010)

##### *L'aire de répartition et habitat*

Espèce endémique du Sahara et Sahara indienne, répandue dans les pâturages désertiques, commune au Sahara septentrionale et rare dans le Sahara centrale (Quezel et Santa, 1963).

##### *Les critères morphologiques*

Plante herbacées (Quezel et Santa, 1963) (figure 1 a). Feuilles longuement atténuées en pointe, denticulées dans toute leur moitié supérieure, et élargies en cœur à la base (Ozenda, 2004). Capsule large de 4 à 5 mm, présentant une construction annulaire vers son milieu (Quezel et Santa, 1963) (figure 1 c). Caroncule de 4 à 5 côtes épaisses (Quezel et Santa, 1963; Ozenda, 2004). Graines lisses (figure 1d).

#### 2.2. *Euphorbia granulata* Forssk. Variété genuina.

##### *L'aire de répartition et habitat*

Plante Saharo-arabique, Saharo-sindienne, commune aux Sahara septentrional et central répandue dans les sols sableux (Quezel et Santa, 1963 ; Ozenda, 2004; Benchelah et al., 2000; Sahki et Sahki Boutamine, 2004).

##### *Les critères morphologiques*

Plante annuelle étalée en cercle sur le sol (Sahki et Sahki Boutamine, 2004) (figure 2 a). Racine pivotante. Tiges très rameux (Benchelah et al., 2000) (figure 2 b). Feuilles opposées, à bords entiers, ovoïdes (Sahki et Sahki Boutamine, 2004). Fleurs petites à l'aisselle des feuilles à cyathe d'un rouge carminé, bordées d'une aile membraneuse blanche (Quezel et Santa, 1963; Ozenda, 2004; Benchelah et al., 2000 ; Sahki et Sahki Boutamine, 2004) (figure 2 d). Graines quadrangulaires portant de petits tubercules et dépourvues de caroncule (Sahki et Sahki Boutamine, 2004).



**Figure 1.** *Euphorbia retusa*. a: Plante entière, b : ramification, c: capsules, d: graines. (Photo originale).



**Figure 2.** *Euphorbia granulata*. a : Plante entière, b : ramification, c : capsules, d : cyathe (Lahmadi S. 2016).



### 3. Les radicaux libres

#### 3.1. Le stress oxydant et les radicaux libres

Le stress oxydant se définit comme étant un déséquilibre dans la balance antioxydants/prooxydants et par conséquent une perturbation des métabolismes où la cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques (Favier, 2003; Syed, 2015, Borg et Reeber, 2008). Cette production excessive des radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides membranaires, des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides (Favier, 2003 ; Haleng et *al.*, 2007). Par ailleurs, un radical libre est défini comme une molécule possédant un ou plusieurs électrons libres. Cet électron libre rend très réactive. La membrane mitochondriale et le réticulum endoplasmique (les microsomes) sont les principaux sites de production des radicaux libres. Ainsi, les oxydases au sein de l'organisme peuvent être également à l'origine de radicaux libre (Borg et Reeber, 2008).

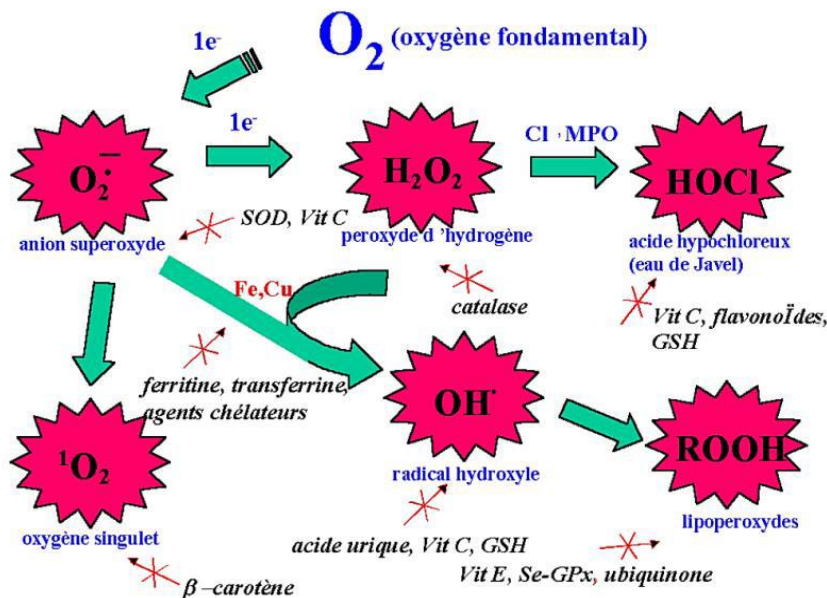
#### 3.2. Principaux radicaux libres

On peut distinguer deux groupes de radicaux libres ; les radicaux primaires et les radicaux secondaires où ces derniers se forment par la réaction des radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule. Les radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$ , le radical hydroxyle  $OH^{\cdot}$ , de l'azote tel le monoxyde d'azote  $NO^{\cdot}$ . D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet  $^1O_2$ , le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou le nitroperoxyde (ONOOH), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi des réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène ERO ou ROS (reactive oxygen species) (figure 3) (Favier, 2003).

#### 3.3. Les moyens de défense contre les radicaux libres

Dans le cas d'une production physiologique de radicaux libres, l'organisme dispose d'un système efficace de protection qui lui permette de lutter contre les ERO. Ces systèmes de défenses caractérisés par des mécanismes d'antioxydation à savoir des

mécanismes endogènes de nature enzymatique notamment les superoxydes dismutases (SOD) et les glutathion peroxydases (GPxs). Les mécanismes exogènes non enzymatique tel que le glutathion et les protéines-thiols, la vitamine C, la vitamine E, les caroténoïdes, le coenzyme Q<sub>10</sub>, l'acide urique, la bilirubine et les polyphénols (Haleng et *al.*, 2007) (figure 3).



**Figure 3.** Aperçu des différentes espèces réactives de l'oxygène ERO et des antioxydants régulateurs de leur production (Haleng et *al.*, 2007).

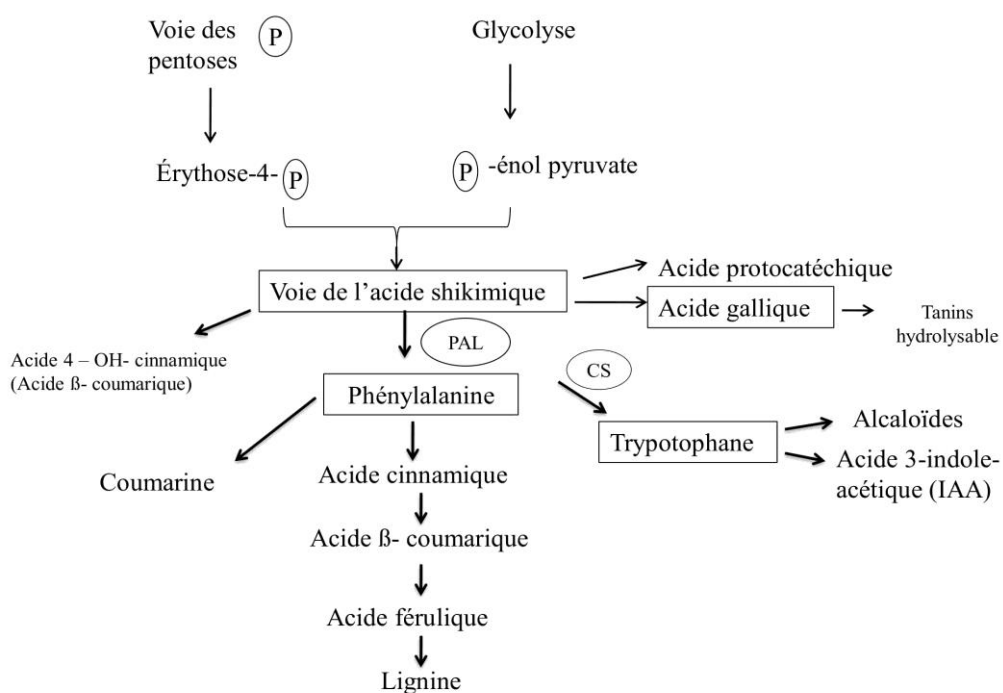
#### 4. Les composés phénoliques

Le métabolisme chez les plantes peut être subdivisé en métabolites primaires (glucides, acides aminés, lipides et acides nucléiques) et en métabolites secondaires. Les métabolites primaires sont à la base de la machinerie moléculaire de toutes cellules et les métabolites secondaires sont des molécules synthétiques ne peuvent se rencontre dans des tissus spécifiques, ou à des stades du développement particuliers (Hopkins, 2003). Par ailleurs, les métabolites secondaires appartiennent à des groupes chimiques variés dont les trois principales classes sont les composés phénoliques, les alcaloïdes et les terpènes (Macheix et *al.* 2005).

De même, les composés phénoliques sont très diversifiés. Ils sont caractérisés par la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant plusieurs fonctions hydroxyles OH (Macheix et *al.*, 2005).

## 4.1. Biosynthèse des composés phénoliques

Les acides aminés aromatiques, phénylalanine et tyrosine sont à l'origine de la formation de la plupart des molécules phénoliques chez les végétaux. Ils sont formés par la voie de l'acide shikimique à partir de sucres simples, suivi par la désamination de la phénylalanine à l'acide cinnamique qui est directement à l'origine de la séquence biosynthétique des composés phénoliques par la voie des phénylpropanoïdes (Macheix *et al.* 2005) (Figure 4).



**Figure 4.** La voie du shikimate est au centre de synthèse de divers métabolites primaires et secondaires. PAL=phénylalanine ammonialyase. CS=chalcone synthase (Hopkins, 2003).

## 4.2. Principales classes des composés phénoliques

La complexité des différents composés phénoliques présentés chez les végétaux (complexité du squelette de base, degré de modifications de squelette et les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules tel que les glucides, lipides, protéines et autres métabolites secondaires) implique de regrouper ces composés en de nombreuses classes. Selon la forme de la structure chimique, les composés phénoliques peuvent être

classés en deux groupes (La forme phénolique simple et la forme phénolique condensée) (Macheix et *al.*, 2005).

### 4.2.1. Les formes les plus simples

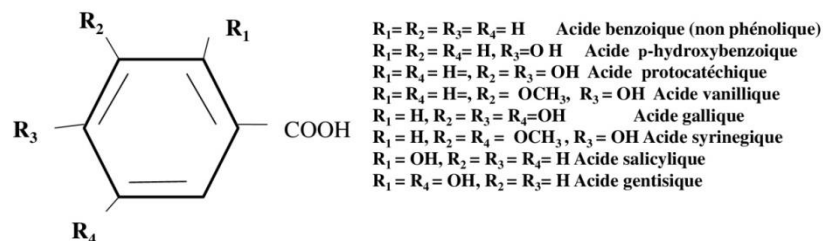
Les formes phénoliques les plus simples présentent des structures chimiques allant du simple phénol en C6 aux flavonoïdes en C15 et à des molécules proches (Macheix et *al.*, 2005).

#### a. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des composés phénoliques possèdent une forme chimique simple allant du simple phénol en C6. Parmi les acides phénoliques les plus connus: les acides hydroxybenzoïques, les acides hydroxycinnamiques (Macheix et *al.*, 2005).

#### *Les acides hydroxybenzoïques*

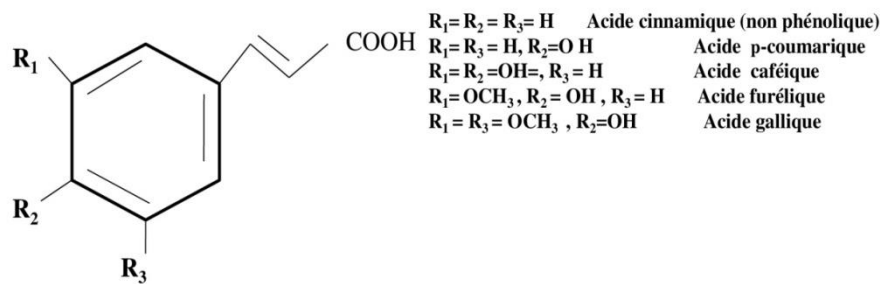
Les acides hydroxybenzoïques sont dérivés de l'acide benzoïque et ont une formule de base de type C6-C1. Les principaux hydroxybenzoïques (*p*-hydroxybenzoïque, protocatéchine, vanillique, gallique, syringique, salicylique, gentisique) (Macheix et *al.*, 2005) (Figure 5).



**Figure 5.** Acides hydroxybenzoïques (Macheix et *al.*, 2005).

#### *Les acides hydroxycinnamiques*

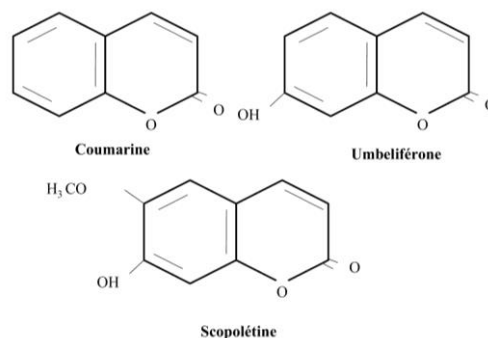
Les acides hydroxycinnamiques sont dérivés de l'acide cinnamique et représentent une classe très importante dont la structure de base (C6-C3). Les principaux hydroxycinnamiques (*p*- coumarique, caféique, férulique et sinapique) (Macheix et *al.*, 2005) (Figure 6).



**Figure 6.** Acides hydroxycinnamiques (phénylpropanoïdes) (Macheix et *al.*, 2005).

### b. Les coumarines

Les coumarines sont dérivées de l'acide hydroxycinnamique par cyclisation interne de la chaîne latérale. Les principaux coumarines ( Umbelliférone, esculetine et scopolétine) (Figure 7) (Hopkins 2003; Macheix et *al.*, 2005).



**Figure 7.** Les principales coumarines (Macheix et *al.*, 2005).

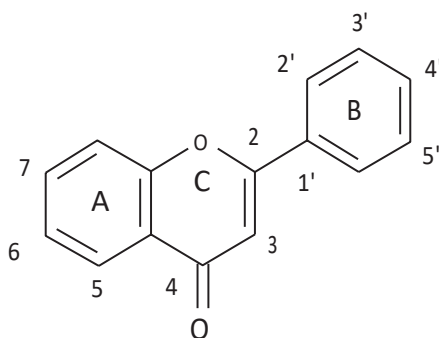
### c. Les flavonoïdes

#### a- Biosynthèse

Les flavonoïdes sont composés de trois cycles, nommés A, B et C. Le cycle B et le cycle C sont issus de la voie de l'acide shikimique via la phénylanine et l'acide *p*-coumarique. Les six atomes de carbone du cycle A dérivent de l'acide malonique, sous la forme d'un complexe malonyl-coenzyme A (malonyl-CoA). L'enzyme clé est la chalone synthase (CHS) qui provoque la condensation séquentielle de trois molécules de malonyl-CoA et d'une molécule de *p*-coumarique, formant de la naringénine-chalcone (Hopkins, 2005).

### b- Structure chimique et classification

Les flavonoïdes sont des dérivés de l'enchaînement benzo- $\gamma$ -pyrone (Ghedira, 2005) (Figure 8). Selon la nature de différentes substitutions présentes sur les cycles de cette molécule et leur degré de saturation, il existe plusieurs classes de flavonoïdes notamment: les flavones, les flavonols, les flavanones, les flavanes, les isoflavones, les chalcones et les anthocyanidines (Figure 9) (Macheix *et al.*, 2005).



**Figure 8.** Structures de l'enchaînement benzo- $\gamma$ -pyrone (Ghedira, 2005)

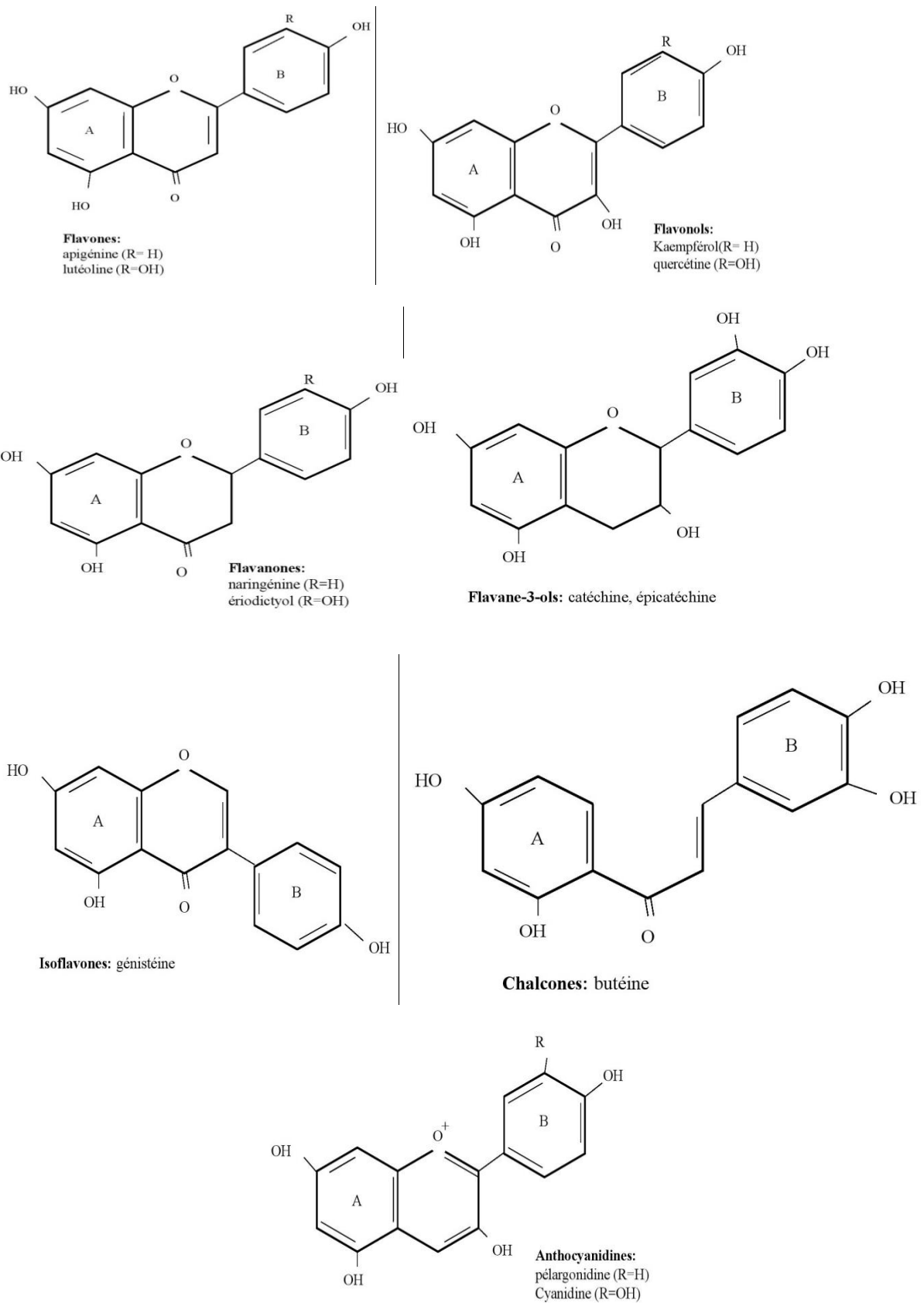


Figure 9. Les principales classes de flavonoïdes (Macheix et al., 2005).

### c- Intérêt biologique des flavonoïdes

Les flavonoïdes jouent un rôle primordial dans la croissance des plantes comme le kaempferol et la quercitrine. De plus, ils sont également importants dans la pigmentation des organes végétaux, dont les flavonoïdes les plus colorés sont les anthocyanidines et les anthocyanes. Pratiquement tous les flavonoïdes, spécialement les flavones et les flavanols, absorbent fortement les rayons ultraviolets UVB. Ils attirent les insectes pollinisateurs. En outre, les flavonoïdes présentent des activités antioxydantes, antimicrobiennes, antiallergiques, anti-ulcérogènes, antihépatotoxiques et antifongiques (Ghedira, 2005). Les flavonoïdes sont très utilisés en systématique des plantes (Judd et *al.*, 2002).

#### 4.2.2. Les formes condensées

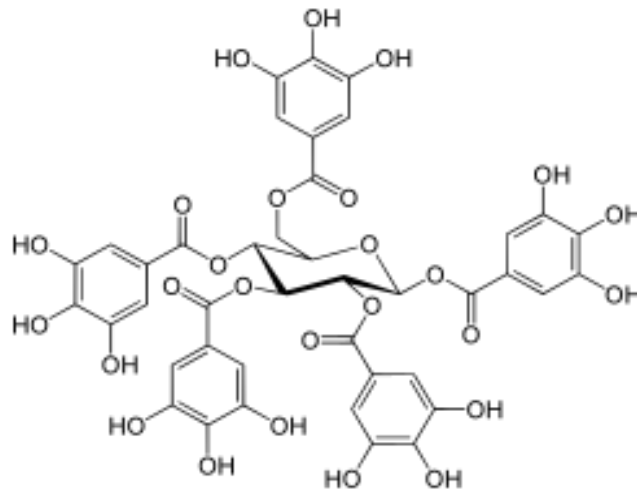
Ces composés résultent généralement de la condensation de certaines des formes simples précédemment évoquées. Cependant, les formes condensées exigent une dégradation chimique ou enzymatique pour les étudier. Les deux grands groupes de formes phénoliques condensées : les tannins et les lignines (Macheix et *al.*, 2005).

##### *Les tannins*

Le terme tannin provient d'une pratique ancienne qui utilisait des extraits de plantes pour tanner les peaux d'animaux. Ces composantes contiennent des dérivés phénoliques qui se lient aux protéines. On distingue deux catégories de tanins: les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Hopkins, 2005).

*Les tannins hydrolysables*: ils sont des sources industrielles abondantes chez les dicotylédones et certains arbres (Macheix et *al.*, 2005). La structure de ces composantes est constituée d'un glucide, habituellement le glucose, dont un radical hydroxyle forme une liaison ester avec l'acide gallique. Les résidus d'acide gallique se lient entre eux pour former un grand polymère réticulé (Hopkins, 2005). La forme simple de tannins hydrolysables est le penta-galloylglucose (figure 10).



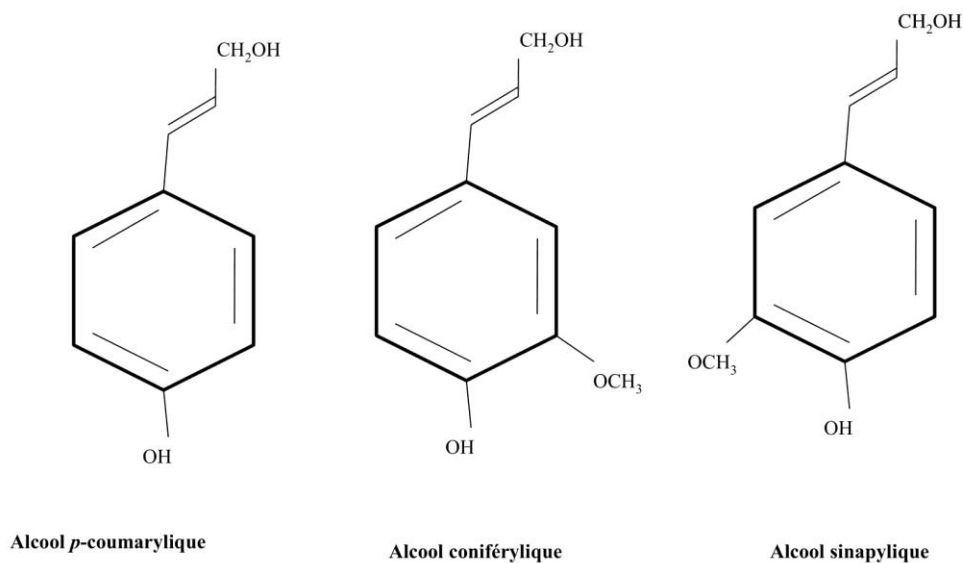


**Figure 10.** Le penta-galloylglucose (Macheix et *al.*, 2005)

*Les tannins condensés:* ils sont des oligomères ou des polymères de flavane-3-ols (éventuellement de flavane-3,4-diols) dérivés de la (+) catéchine ou de ses nombreux isomères (Macheix et *al.*, 2005). Les liaisons entre les flavonoïdes ne sont hydrolysables mais peuvent être oxydées par les acides forts libérant des anthocyanidines (Hopkins, 2005).

### ***La lignine***

La lignine est localisée dans les parois cellulaires et plus spécialement dans les parois secondaires des tissus conducteurs (bois), c'est un polymère fortement ramifié, formé par trois alcools phénoliques simples : l'alcool *p*-coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapyliques sous l'action des peroxydases et/ou des laccases (figure 11) (Hopkins, 2005).

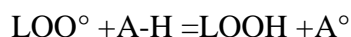


**Figure 11.** Les trois monolignols dérivés des acides hydroxycinnamique (Hopkins, 2005).

### 4.3. Principales potentialités biologiques des composés phénoliques

#### 4.3.1. Activité antioxydante

Les antioxydants sont des composés chimiques présents dans l'organisme adaptés à la modulation de l'oxydation des biomolécules (Syed, 2015). Les antioxydants peuvent être classés selon leurs modes d'actions tels que : l'interruption de la chaîne de propagation des réactions radicalaires par chélation des métaux de transition, désactivation des espèces oxygénées réactives, inhibition de l'activité des enzymes de peroxydation et abaissement de la pression partielle de l'oxygène (Fidelis, 2001). En outre, la classification des antioxydants est divisés selon leurs origines en deux types d'antioxydants ; endogènes comme les enzymatiques notamment : la catalase, la glutathion peroxydase et le superoxyde dismutase. Par contre les antioxydants exogènes (nutritionnels) sont présentés par les vitamines (vitamine A, E, et C), les oligo-éléments (le sélénium, le cuivre, le zinc) et les polyphénols (Desmier, 2016). Particulièrement, la nature de la chaîne substituée de cycle benzénique des polyphénols confère à la fonction phénol un caractère plus acide que les groupements alcool : elle donne donc facilement un proton H<sup>+</sup> pour former l'ion phénoxy. Cette propriété chimique donne aux composés phénoliques leur caractère antioxydant. En perdant un hydrogène au profit des lipides LOO<sup>o</sup>, ils les stabilisent sous forme d'hydroperoxydes LOOH et inhibent les réactions de propagation de la chaîne d'oxydation. (Fidelis, 2001).



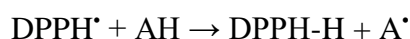
Les polyphénols sont d'excellents piègeurs des ERO et de très bons chélateurs des métaux de transition comme le fer et le cuivre (Haleng et *al.*, 2007). Les polyphénols grâce à leur propriété antioxydante jouent un rôle dans la santé humaine soit en tant que composants de la ration alimentaire, soit en entrant dans la composition de médicaments ou bien dans l'utilisation en agroalimentaire. Cependant, ils interviennent dans le végétal lui-même pour neutraliser les radicaux libres formés à la suite de stress. Ainsi, les flavonoïdes participent à la régulation de l'état d'oxydation à l'intérieur de la mitochondrie, ils interviennent aussi dans l'expression de gènes codant certaines superoxyde-dismutases mitochondriales, enzymes protectrices de dégrader l'anion superoxyds (Macheix et *al.*, 2005).

### a- Méthode d'évaluation de l'activité antioxydante

Selon Tel et *al.* (2012), la composition chimique complexe des extraits végétaux implique d'utiliser différentes méthodes *in vitro* pour évaluer les activités antioxydantes, parmi ces méthodes:

#### ➤ Méthode de piégeage du radical DPPH

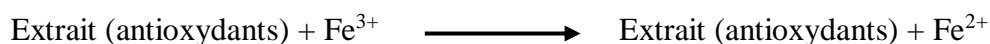
Le DPPH<sup>•</sup> ou (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) est un radical stable de couleur bleue présente une intense coloration violette à température ambiante, qui disparaît au contact d'une substance donneuse de protons selon la formule suivante (1):



C'est une méthode rapide (Kalidindi et *al.*, 2015) qui mesure l'intensité de la coloration par spectrophotométrie. Cette intensité est proportionnelle avec la capacité à piéger le radical libre et par conséquent le potentiel antioxydant (Öztürk et *al.*, 2007; Ullah, 2017).

#### ➤ Méthode du pouvoir réducteur des ions ferriques et chélation des ions ferreux.

L'activité réductrice du fer est basée sur la réaction d'oxydoréduction entre l'extrait et les ions métalliques de transition du fer. La coloration de la solution change d'un jaune au vert tout dupant du pouvoir de la réduction de l'extrait testé (Saeed et *al.*, 2012). En effet, le  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  fournit des ions  $\text{Fe}^{3+}$  qui seront réduits par la capacité de l'extrait de plantes à céder des électrons :



En outre, la capacité chélatrice est basée sur l'inhibition de la formation du complexe Fe(II)-Ferrosine après le traitement des échantillons avec les ions  $Fe^{2+}$  (Labeled, 2015).

### ➤ **Méthode de blanchiment de la $\beta$ -carotène**

La méthode du blanchiment de la  $\beta$ -carotène est utilisée pour évaluer le potentiel d'un extrait à neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique qui attaquent simultanément le  $\beta$ -carotène et ayant comme résultat le blanchiment du  $\beta$ -carotène et la disparition de sa couleur orange (Djeghim, 2016).

### ➤ **Méthode de l'ABTS**

L'activité antioxydante d'un produit est déduite de sa capacité à neutraliser le radical  $ABTS^{*+}$ , obtenu à partir de l'ABTS: sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis- (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique).

L'obtention du radical cation résulte du contact de l'ABTS généralement avec la présence de persulfate de potassium qui donne une solution d'une couleur bleu intense (Re et *al.*, 1999).

### ➤ **Méthode du CUPRAC**

Le test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre CUPRAC (cuivrique Réduire Antioxydant Capacity) est une méthode de mesure du potentiel antioxydant utilisée généralement pour les polyphénols et les vitamines C et E Apak *et al.* (2004). Le principe de ce test est basé sur la réduction de  $Cu^{2+}$  en  $Cu^{+}$  en présence des antioxydants et de Néocuproïne (2,9-diméthyl-1,10-phénanthroline) (Tel et *al.*, 2012).

### **a- Autres méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante**

Il existe d'autres méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante notamment, l'activité totale, l'activité d'absorption des radicaux d'oxygène (test ORAC : Oxygen Radical Absorbance Capacity), le test TRAP (Total radical-trapping antioxidant parameter) et HORAC (Assay Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity).

### Activité antimicrobienne

Les polyphénols présentent une activité antimicrobienne et antifongique importante (Hopkins, 2005). En effet, certains composés comme le catéchine, la quercétine et l'acide gallique sont dotés d'un effet important sur les souches *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus* (Ksouri et al., 2009). Par ailleurs, les composés phénoliques et les quinones qui en dérivent par oxydation peuvent se lier aux protéines et bloquent ainsi les activités enzymatiques des micro-organismes (Macheix et al., 2005).

#### 4.3.2. Activité antivirale

Les polyphénols sont reconnus pour leurs propriétés antivirales, en particulier, l'acide salicylique joue simultanément un rôle important comme messenger intracellulaire déclenchant l'induction de l'ensemble des mécanismes qui permettent à la plante de se défendre vis-à-vis des virus comme la mosaïque du tabac (Macheix et al., 2005). Par ailleurs, les polyphénols de *Centaurea aegyptiaca* L. présentent une activité antivirale contre le virus de l'hépatite A (HAV) (Omar Bakr et al., 2016). Certains flavonoïdes tels que le catéchine, la strictinine inhibent l'activité du virus de l'influenza (Chen et al., 2015).

#### 4.3.3. Activité anti-inflammatoire

Différents travaux ont montrés l'activité anti inflammatoire des composés phénoliques (Ibrahim Elshamy et al., 2017). Des propriétés anti-inflammatoires sont attribuées au flavonoïde epigallocatechin-3- gallate (EGCG) (Im et al., 2012), au lipide phénolique (LDT11) (De Souza et al., 2018) au kaempférol (Wang et al., 2013) et au acide acétylsalicylique (Nauman et al., 2018).

#### 4.3.4. Activité anticancéreuse

Certaines molécules phénoliques d'origine végétale comme les phytoestrogènes des légumineuses ayant des activités anticancéreuses (Macheix et al., 2005). En outre, Des études in vitro ont permis de montrer que les acides phénoliques tels que l'acide caféique diminuent la prolifération des cellules cancéreuses de HeLa (The human cervical cancer cell line, HeLa) (Ye et al., 2010). Autres résultats suggèrent que epigallocatechin-3-O-gallate EGCG empêchent les récepteurs épidermiques (EGFR) responsables de l'activité de la tyrosine kinase (Filippi et al., 2017).

### 4.3.5. Activité photoprotective

Pratiquement tous les flavonoïdes, spécialement les flavones et les flavanols, absorbent fortement les rayons ultraviolets UVB (Macheix et *al.*, 2005). L'activité photoprotective c'est la capacité d'un produit à protéger la peau contre les rayonnements UVB et UVA. Cette activité est déterminée par le facteur de protection solaire (FPS) ou SPF (Sun Protection Factor) qui indique le niveau de protection des produits contre les dommages induits par les UVB, principalement contre le coup de soleil (Afssaps, 2011). De plus, le facteur de protection solaire est un indice qui permet de classer les produits de protection solaire en quatre catégories (tableau 3). Ainsi, plus l'indice FPS est élevé plus la protection solaire contre le coup de soleil est importante (Mbanga et *al.*, 2014).

**Tableau 3 :** Les différentes catégories de protection solaire (Schalka et Reis, 2011)

Catégorie	Facteur de Protection Solaire FPS
<b>Faible protection</b>	2-15
<b>Moyenne protection</b>	15-30
<b>Haute protection</b>	30-50
<b>Très haute protection</b>	>50

#### *La relation entre la protection contre les UVB et le FPS*

L'indice de protection est aussi le rapport entre la dose d'UV nécessaire pour obtenir un coup de soleil avec et sans la crème solaire. Techniquement, en exposant expérimentalement la peau à un rayonnement constant dans le temps, si une personne développe un coup de soleil au bout de dix minutes sans protection, alors un FPS égale à 30 signifie qu'il faudra trois cent minutes (soit trente fois dix minutes ou cinq heures) pour obtenir le même coup de soleil avec ce produit de protection solaire ( Brunet, 2014) ( tableau 4).

**Tableau 4 :** Relation entre le FPS et la protection contre les UVB (Brunet, 2014)

Valeur de l'indice FPS	% d'UV non arrêtés	% d'UV arrêtés
6	1/6 soit 16	83%
10	1/10	90%
15	1/15	94%
20	1/20	95%
25	1/25	96%
30	1/30	97%
50	1/50	98%
50+	1/50 + soit + 2%	+ 98%

### 4.3.6. Autres activités biologiques

Il existe d'autres méthodes d'évaluation de l'activité biologique telles que l'activité anti-diabète, l'activité cardio-protectrice, l'activité antiallergique et l'activité antiulcérogène (capables de protéger la muqueuse gastrique contre divers agents ulcérogènes).

## 4.4. L'extraction des polyphénols par les solvants

### 4.4.1. Extraction

L'extraction des polyphénols est une opération qui consiste à séparer certains composés végétaux à fin d'isoler et d'analyser ce produit. L'organisme peut être solide ou liquide et le produit d'extraction est un liquide (solvant). Donc selon l'opération de transfert de masse d'un organisme on peut déterminer deux types d'extraction : extraction solide-liquide et extraction liquide-liquide (Oueslati, 2013).

Il existe plusieurs méthodes d'extraction des composés phénoliques par solvant notamment, la macération, la percolation, la décoction, extraction par soxhlet, extraction assistée par ultrason, extraction assistée par micro-ondes, extraction par ultrasons, extraction sous haute pression hydrostatique, extraction par fluide supercritique ou par eau sous critique

(Bimakr et *al.*, 2010; Chaisawangwong et Gritsanapan, 2009; Goga, 2012; Tunchaiyaphum et *al.*, 2013; Vidic; 2014). Par ailleurs, les facteurs influençant sur l'extraction des composés phénoliques sont des facteurs liés :

- 1- Au solvant (la nature chimique du solvant et la concentration du solvant organique) ;
- 2- A la méthode d'extraction employée (la température, le temps d'extraction et le nombre de cycles d'extraction) ;
- 3- A l'échantillon (stade de développement végétatif, la taille des particules et le type d'organe).
- 4- rapport masse de l'échantillon /volume du solvant.

(Baldosano et *al.*, 2015; M'Hiri, 2015; Sardsaengjun et Jutiviboonsuk, 2015).

### **4.4.2. Les solvants d'extraction**

Les solvants sont des produits chimiques liquides capables de dissoudre, de diluer et d'extraire d'autres substances en formant une solution homogène sans les modifier ni se modifier eux-mêmes (INRS, 2010).

#### ***L'utilisation des solvants***

Les solvants sont utilisés comme des dégraissants, des adjuvants, des diluants, des décapants et des purifiants. De plus, les solvants sont utilisés aussi dans l'extraction, la séparation et la purification des substances (INRS, 2005).

#### ***Propriétés physico-chimique des solvants***

Les propriétés physico-chimiques des solvants sont différentes : polarité, densité, point d'ébullition, tension de vapeur, chaleur de vaporisation, taux d'évaporation, viscosité, tension superficielle, paramètre de solubilité, indice kauri-butanol (KB) et constante diélectrique (Patrascu, 2010). Il sont reliées étroitement à la performance technique et déterminent les types d'utilisation industrielle des solvants et leur mise en œuvre.

#### ***Classification des solvants selon leur structure moléculaire***

- 1- Les solvants protiques polaires (également appelés solvants protogènes): ils peuvent former des liaisons hydrogènes notamment ; l'eau, le méthanol, l'éthanol ;



- 2- Les solvants aprotiques polaires : possédant un moment dipolaire non nul et dénué d'atomes d'hydrogènes susceptibles de former des liaisons hydrogènes : par exemple, l'acétonitrile (CH<sub>3</sub>CN), le diméthylesulfoxyde (DMSO, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO);
- 3- Les solvants aprotiques apolaires : possédant un moment dipolaire permanent comme le benzène et les hydrocarbures.

(INRS, 2005; INRS, 2010)

### ***Classification des solvants selon leur composition***

- 1- Les solvants inorganiques : ce sont des molécules ne contiennent pas de carbone, notamment ; l'eau, les solutions aqueuses contenant des additives (tensioactifs, solution tampon...) et l'acide sulfurique concentré ;
- 2- Les solvants organiques : les solvant organiques sont des molécules qui contiennent au moins un atome de carbone dans leur structure moléculaire. Ils sont classés en 3 familles
  - Les solvants hydrocarbures : on distingue les hydrocarbures aliphatiques, les hydrocarbures aromatiques et les mélanges pétroliers complexes ;
  - Les solvants oxogénés (les alcools ; les cétones ; les esters, les éthers, les éthers de glyco, les acides, DMF, DMSO et HMPT).
  - Les solvants halogénés : les hydrocarbures halogénés, perchloroéthylène, trichloroéthylène, dichlorométhane, chloroforme, tétrachlorométhane (nocifs pour la couche d'ozone).

Il ya aussi d'autres solvants qui ont un usage industriel moins important comme les hydrocarbures azotés ( amides, amines....) et agrosolvants.

(INRS, 2005; INRS, 2010).

## **4.5. Quantification, séparation et identification des polyphénols**

### **4.5.1. Technique spectrophotométrique**

La techniques utilisées pour la détermination quantitative des polyphénols est la spectrophotométrie (UV - visible) . Cette technique consiste à mesurer la densité optique d'une substance chimique donnée en solution où l'absorbance de la lumière est en fonction de la concentration d'extrait (Muanda, 2010). Par ailleurs, le dosage des composés phénoliques donne une estimation rapide de la teneur en phénols totaux. Ce dosage est varié selon la classe des polyphénols à analysée ( Machiex et *al.*, 2015). En effet, le réactif Folin-Ciocalteu est

utilisé pour la détermination des polyphénols totaux (Singleton et Rossi, 1965). En outre, la complexation des composés phénoliques avec les ions d'aluminium  $Al^{+3}$  est utilisée pour la détermination des flavonoïdes (Öztürk et *al.*, 2007).

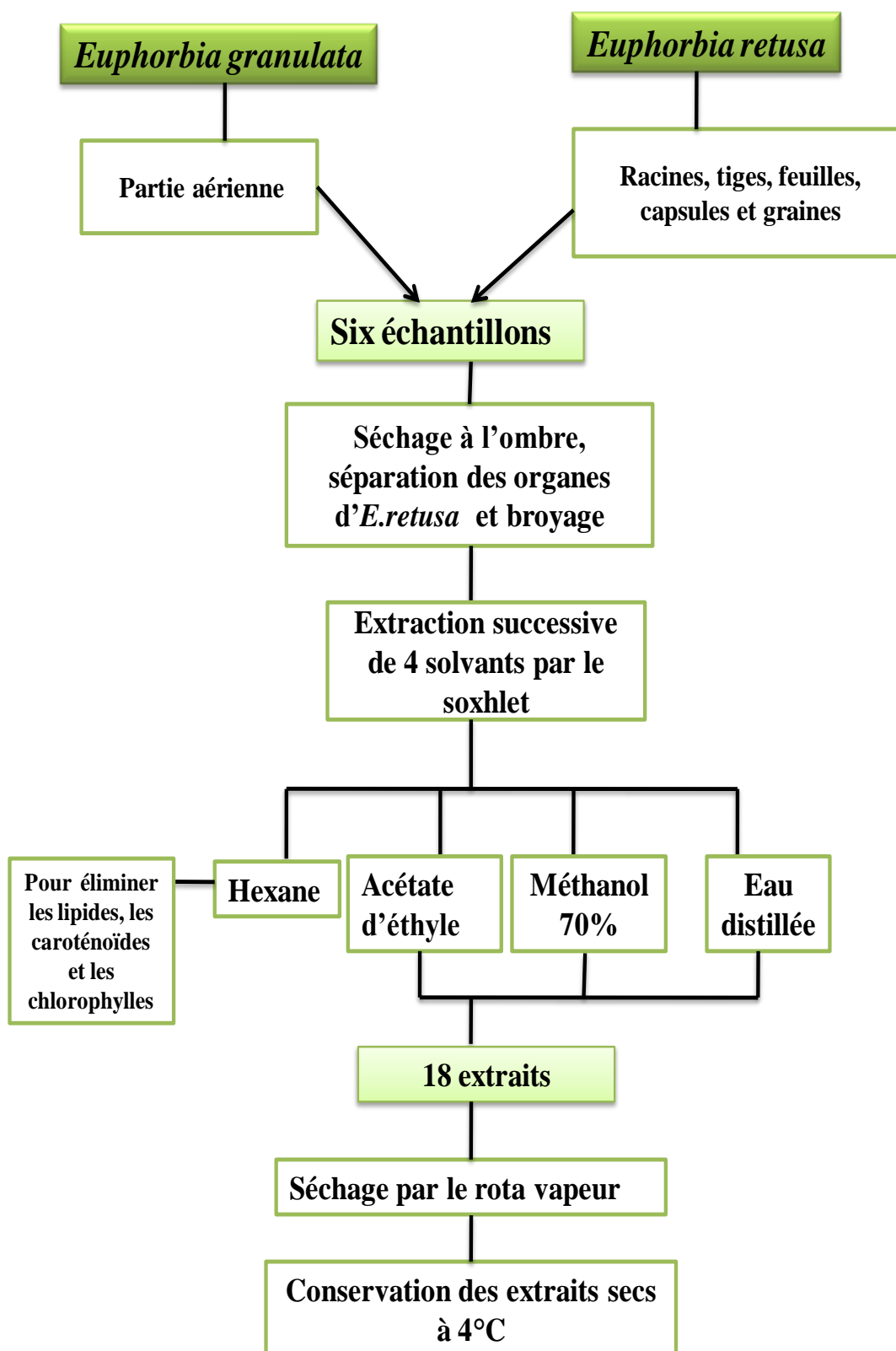
### 4.5.2. Technique chromatographique

La chromatographie est une méthode physique de séparation et d'analyse quantitative et qualitative des composés basée sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe et l'autre mobile. Les différents composés de l'échantillon sont séparés en fonction de leurs vitesses d'adsorption et désorption successive sur la phase stationnaire, soit de leur solubilité différente dans chaque phase (Dari, 2016). Par ailleurs, plusieurs techniques chromatographiques ont été utilisées pour la quantification et la détermination des composés phénoliques. En effet, la séparation et l'identification des métabolites sur Couche Mince (CCM) et sur colonne sont aussi développées pour l'analyse des composés phénoliques, ainsi que la séparation par électrophorèse sur papier peuvent donner un certain intérêt pour réaliser une première approche qualitative des composés phénoliques (Macheix et *al.*, 2015). La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) est la technique la plus performante et la plus rapide pour l'analyse quantitative et qualitative d'un extrait phénolique complexe. Elle est devenue un outil dominant analytique pour la séparation et la détermination des composés phénoliques avec différents systèmes de détection à savoir le système de détection d'iode (DAD). À côté de la CLHP, il y a une autre technique plus performante de séparation des composés phénoliques est l'électrophorèse capillaire (EC) (Macheix et *al.*, 2015). En outre, la spectrométrie de masse (MS), la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS ou  $MS^n$ ) et la spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS) sont aussi des techniques analytiques utilisées également pour identifier et élucider les structures chimiques des molécules. Le couplage du CLHP avec MS (LC-MS) permet la caractérisation des structures complexes comme les procyanidines et confirme ainsi les hypothèses structurales (Oueslati, 2013).

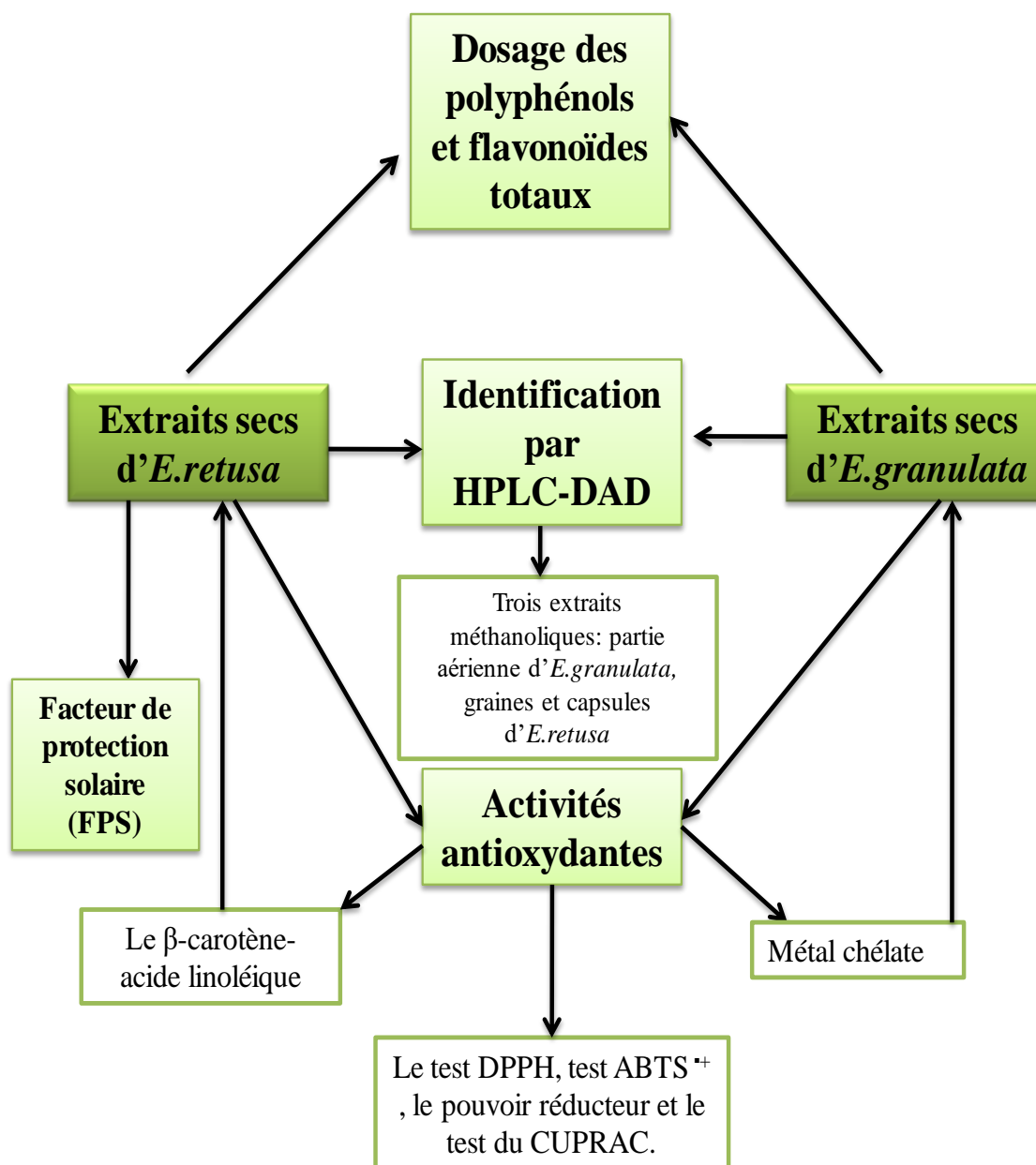
Une autre technique plus puissante pour la détermination structurale des composés phénoliques de nombreuses molécules chimiques est la résonance magnétique nucléaire (RMN). Elle est considérée comme la meilleure technique pour le dépistage des composés d'un extrait appartenant à des classes variées (Macheix et *al.*, 2015). Les principaux noyaux étudiés sont le proton  $^1H$ , le carbone  $^{13}C$ , le phosphore  $^{31}P$ , et l'azote  $^{15}N$  (Oueslati, 2013).

## Chapitre II. Matériel et méthodes

Malgré les recherches considérables réalisées ces dernières années dans le domaine de la phytochimie, la valorisation des espèces sahariennes utilisées dans la médecine traditionnelle demeure un challenge. En effet, les études préliminaires sur les polyphénols et leur pouvoir antioxydant est un point de départ important qui ouvre des horizons scientifiques dans le domaine médical et pharmaceutique. Dans ce contexte nous nous sommes intéressés à évaluer les composés phénoliques et les activités biologiques des extraits d'acétate d'éthyle, méthanolique et aqueux de la partie aérienne d'*E. granulata*, des racines, des tiges, des feuilles, des capsules et des graines d'*E. retusa*. Par ailleurs, le choix de ces espèces est basé principalement sur le manque des études algériennes concernant les composés phénoliques et leurs activités biologiques de ces deux plantes. En effet, dans cette partie expérimentale, deux axes ont été envisagés: le premier axe concerne d'extraction des composés phénoliques par les solvants (figure 12) et le deuxième axe compte une analyse phytochimique des composés phénoliques: détermination de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes totaux, évaluation des activités antioxydantes, évaluation du facteur de protection solaire (SPF) et identification des composés phénoliques par CLHP-DAD (figure 13).



**Figure 12.** Diagramme de préparation des échantillons et d'extraction des composés phénoliques par les solvants.



**Figure 13.** Diagramme des analyses phytochimiques effectuées.

## 1. Matériel végétal

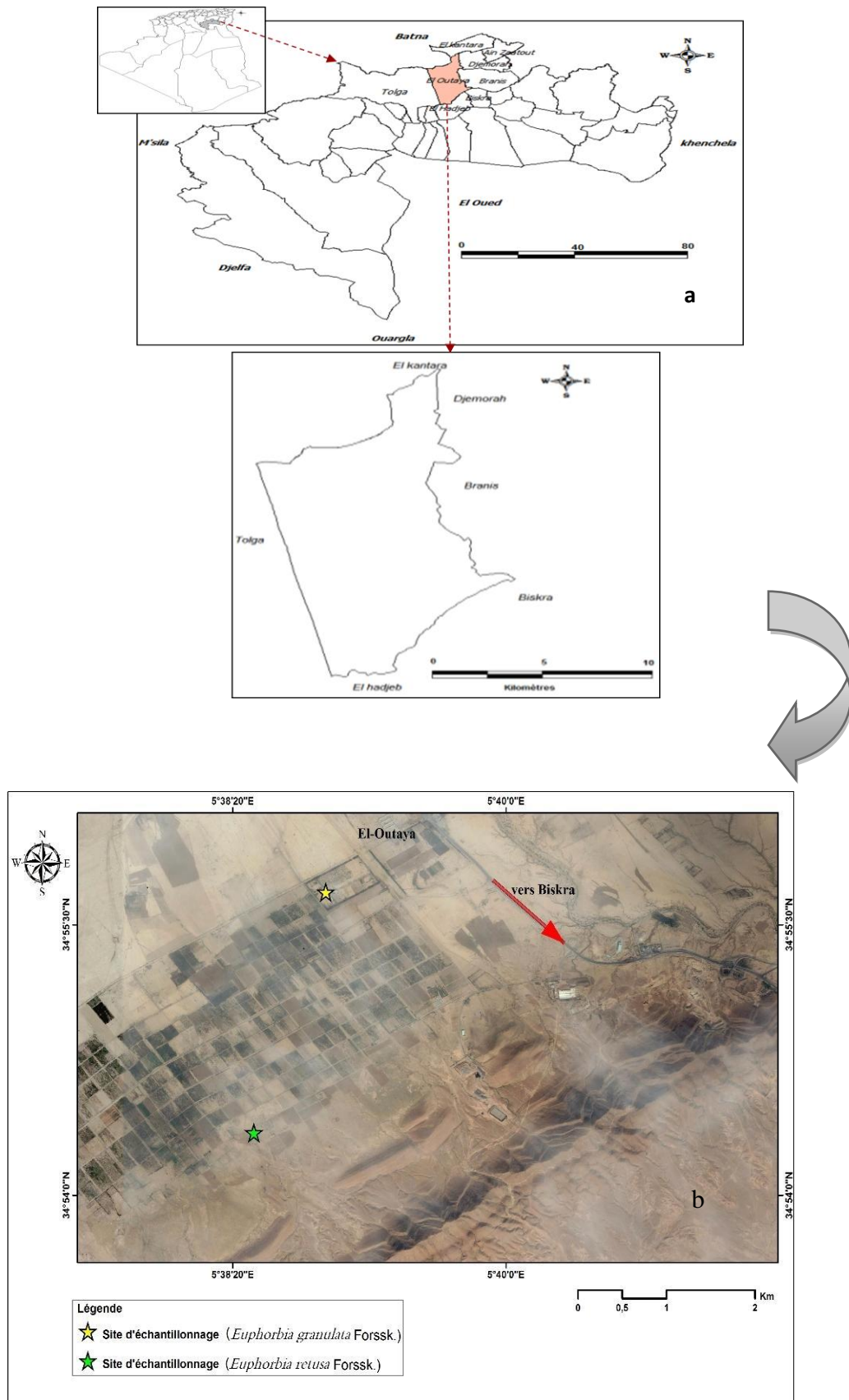
Le matériel végétal collecté dans cette étude est constitué par deux espèces du genre *Euphorbia* à savoir: *E.granulata* Forssk et *E.retusa* Forssk. L'identification des espèces a été faite en utilisant deux guides floristiques, l'un est la flore du Sahara (Ozenda, 2004) et l'autre c'est le Hoggar: promenade botanique (Sahki et Sahki Boutemmine, 2004). Outre, Madame Rabia Sahki Boutammine chercheuse à l'Institut National de la Recherche forestière d'Algérie (INRF) a confirmé l'identification des espèces choisies.

### 1. Caractérisation du site de collecte

Les espèces sélectionnées proviennent du périmètre irrigué Lamkimnet de la plaine d'El Outaya, (un lieu-dit Lahzaima) situé au nord de la wilaya de Biskra (figure 14). La plaine appartient à l'étage bioclimatique aride (Bengouga, 2018; Demnati, 2012).

Le prélèvement des échantillons des plantes a été effectuée dans deux différents sites (figure 15) dont, *E.granulata* a été recueilli de la station expérimentale du Centre de Recherche Scientifique et Technique sur les Régions Arides de Biskra (CRSTRA) (altitude 197m, latitude 34°55'40.522" Nord, longitude 5°38'52.521" Est) sachant que la plante pousse sous serre de la tomate.

Par contre les échantillons de l'espèce *E.retusa* est prélevée dans des peuplements végétaux spontanés de la plaine d'El Outaya (altitude 193m, latitude 34°54'21.751" Nord, longitude 005°38'27" Est).



**Figure 14.** Situation géographique de la plaine d'El-Outaya (a : Lahmadi et *al.*, 2017)

(b : Google Earth).

### 3. Collecte et préparation des échantillons

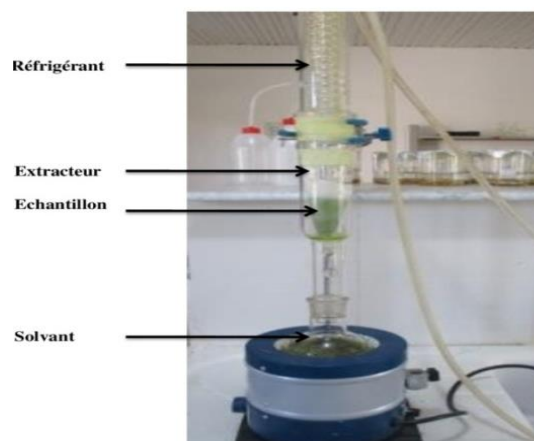
La collecte est effectuée en Juin 2016. Les parties végétales utilisées dans cette étude sont la partie aérienne de la plante *E. granulata*, les racines, les tiges, les feuilles, les capsules et les graines d'*E. retusa*. Notons bien que, la séparation entre les organes d'*E. granulata* est difficile à cause de leur taille minuscule. Le matériel végétal est séché à l'ombre dans un endroit aéré. La durée moyenne de séchage est 7 jours, puis les échantillons séchés sont broyés et conservés dans des flacons en verre ambré à 4 °C.

### 4. Préparation des extraits

#### *Extraction successive par le système Soxhlet*

##### a- Principe

L'extraction a été effectuée par le Soxhlet (figure 16). Ce système est composé d'un ballon contenant une réserve de solvant d'extraction, ce dernier est porté à ébullition. Le vapeur de solvant traversent le tube de distillation et condensent au niveau du réfrigérant à eau, puis ils s'accumulent dans l'extracteur qui porte l'échantillon, suivi par le retour dans le ballon par un siphon qui aspire la solution de la cartouche. Le solvant peut donc recommencer un nouveau cycle d'évaporation – condensation. Donc, le principal avantage de cette méthode est que l'échantillon est continuellement extrait avec du solvant renouvelé (Penchev, 2010).



**Figure 15.** Photo d'un appareil de Soxhlet (Lahmadi S. 2018).



## **b- Mode opératoire**

L'extraction a été réalisée au laboratoire de phytochimie du CRSTRA. Chaque échantillon préparé (la partie aérienne d'*E.granulata*, les racines, les tiges, les feuilles, les capsules et les graines d'*E.retusa*) a été extraite successivement par quatre solvants de polarités croissantes. Tout d'abord on commence par l'hexane (polarité = 0.0) pour éliminer les lipides, les caroténoïdes et les chlorophylles (Fellah et al., 2011) dont les extraits d'hexane ne sont pas pris en considération dans cette étude, suivi par l'acétate d'éthyle (polarité = 4.4), le méthanol (polarité = 5.1) et enfin l'eau distillée étant considéré comme le solvant le plus polaire (10.2). En effet, 20 mg de poudre fine de chaque échantillon est placé dans une cartouche de papier filtre en présence de 200 ml de solvant. L'extraction est faite à une température de 40°C (pour ne pas détériorer les molécules) pour une durée de 6 h pour l'hexane et 8h pour les autres solvants. La solution d'extrait est évaporé sous une pression dans un rota vapeur, les extraits secs sont récupérés et conservés à l'obscurité à 4°C.

## **5. Analyse phytochimiques**

Les analyses phytochimiques effectués sont le dosage des composés phénoliques, les activités antioxydantes et le facteur de protection solaire. Ces analyses ont été réalisés au laboratoire de pharmacologie et toxicologie du Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine (CRBT) et les absorbances sont lue à l'aide d'un lecteur de microplaques (Perkin Elmer, Enspire). Ainsi, toutes les mesures sont répétées 3 fois.

### **5.1. Dosage des composés phénoliques**

#### **5.1.1. Polyphénols totaux**

Le dosage des polyphénols totaux des différents extraits est réalisé par la méthode de Folin-Ciocalteu (Singleton et Rossi, 1965) selon une méthode de dosage adoptée au lecteur microplaque décrite par Müller et al. (2010). Le réactif de Folin-Ciocalteu est réduit en oxyde de tungstène et de molybdène de couleur bleue par les polyphénols. L'intensité de la coloration bleue est proportionnelle avec le taux des composés phénoliques présents dans le milieu (Ouaslati, 2013). En effet, une prise de 20 µl de chaque extrait de plante convenablement dilué est mise dans un eppendorf en présence de 100 µl du réactif de Folin-Ciocalteu, (Folin-Ciocalteu 10 fois dilue dans l'eau distillé) et 75 µl d'une solution de

carbonate de sodium  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (7.5%) (7.5 g de carbonate de sodium dans 100 ml d'eau distillé). Après 120 mn d'incubation, dans des plaques de 96 puits à température ambiante et à l'abri de la lumière, l'absorbance a été lue contre un blanc (MeOH) à 765 nm pour les extraits d'*E.granulata* et sans blanc pour les extraits d'*E.retusa*. Une gamme étalon de trois répétition est préparée avec de l'acide gallique à des concentrations de 50, 100, 200, 300, 400 et 500  $\mu\text{g/ml}$  pour exprimer la teneur en polyphénols des extraits d'*E.retusa* et une autre gamme d'étalon est préparée avec le même acide à des concentrations de 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 et 200  $\mu\text{g/ml}$  pour exprimer la teneur en polyphénols des extraits d'*E.granulata* ( la date du dosage des polyphénols des extraits d'*E.granulata* est différente de celle des extraits d'*E.retusa*). Les teneurs des polyphénols totaux dans les extraits sont exprimées en microgramme ( $\mu\text{g}$ ) équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (mg) d'extrait ( $\mu\text{g}$  GAE/mg d'extrait).

### 5.1.2. Flavonoïdes totaux

La quantification des flavonoïdes est faite selon la méthode de Moreno et al. (2000) pour les extraits méthanoliques d'*E.retusa* et la méthode de Türkoğlu et al. (2007) pour les autres extraits (la date du dosage du dosage des flavonoïdes des extraits méthanoliques d'*E.retusa* est différente de celle des autres extraits). Le premier protocole consiste à mélanger 50 $\mu\text{l}$  d'extrait de plante, 130  $\mu\text{l}$  de MeOH, 10  $\mu\text{l}$  d'acétate de potassium (1M) et 10  $\mu\text{l}$  de nitrate d'aluminium (10%). Après, une prise de 200  $\mu\text{l}$  de ce mélange est transféré dans des plaques de 96 puits. Pour le deuxième protocole, une prise de 50 $\mu\text{l}$  d'extrait de plante est mise dans un eppendorf en présence de 1900  $\mu\text{l}$  de méthanol additionnée de 50  $\mu\text{l}$  d'acétate de potassium (1M) et 50  $\mu\text{l}$  de nitrate d'aluminium (10%). Après 40 mn du temps d'incubation dans des plaques de 96 puits à température ambiante et à l'abri de la lumière pour les deux méthodes, la lecture est effectuée à 415 nm. Une gamme étalon est préparée avec de la quercétine à des concentrations de 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200  $\mu\text{g/ml}$ . Les teneurs en flavonoïdes des extraits sont exprimées en microgramme d'équivalents quercétine par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g}$  GAE/mg d'extrait).

## 5.2. Les activités antioxydantes

### 5.2.1. Piégeage du radical DPPH

Le changement de la coloration violette du radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) à une coloration jaunâtre en présence de composés anti-radicalaires met en évidence le pouvoir antioxydant d'un échantillon par sa capacité à piéger le radical libre. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons. L'activité anti-radicalaire est déterminée par la méthode de Blois (1958). Pour cela, dans des eppendorfs secs et stériles, 40 µl de différentes concentrations des extraits (3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 et 200 µg /ml pour les extraits d'acétate d'éthyle et aqueux d'*Euphorbia granulata*, 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 et 100 µg /ml pour les extraits méthanoliques d'*Euphorbia granulata* et 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 et 400 µg /ml pour les extraits d'*Euphorbia retusa*,) ont été ajoutés à 160 µl de solution de DPPH (6 mg de DPPH est solubilisé dans 100 ml de méthanol). Après une période d'incubation de 30 min dans des plaques de 96 puits à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance a été lue contre un témoin négatif (sans extrait) à 517. Le témoin positif utilisé est un antioxydant de synthèse: le 2,6-di-t-butyl-4-méthylphénol ou butylhydroxytoluène (BHT) et le butylhydroxyanisole (BHA).

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition (PI%), calculés suite à la diminution de l'intensité de la coloration du mélange, selon la formule:

$$PI\% = (A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{Extrait}} / A_{\text{Contrôle}}) \times 100.$$

Où:

- $A_{\text{Contrôle}}$  est l'absorbance de la réaction témoin contenant tous les réactifs à l'exception de l'extrait.
- $A_{\text{Extrait}}$  est l'absorbance de la réaction contenant de l'extrait.

La concentration d'inhibiteur (antioxydant) nécessaire pour diminuer 50 % du taux des radicaux libres a été calculée à partir du graphique de DPPH. Une faible valeur de la  $CI_{50}$  correspondant à une grande efficacité de l'extrait.

### 5.2.3. Piégeage du radical-cation ABTS<sup>•+</sup>

L'activité ABTS est déterminée par la méthode de Re et al.(1999). Cette méthode est basée sur la capacité des composés à piéger le radical-cationique ABTS<sup>•+</sup>, (sel d'ammonium

de l'acide 2,2- azinobis (3 – éthylbenzoline)n – 6sulfonique). Le radical ABTS<sup>•+</sup> d'une couleur vert a été produit par la réaction entre la solution mère d'ABTS<sup>+</sup> (19.2 mg d'une solution méthanolique ABTS (7 mM) dissoute dans un 5 ml de H<sub>2</sub>O) et la solution de persulfate de potassium K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (3.3 mg d'une solution méthanolique de persulfate d'ammonium K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> = 2.45 mM) dissoute dans un 5 ml de H<sub>2</sub>O). Le mélange a été stocké dans l'obscurité à température ambiante entre 12h à 16h. La solution fille d'ABTS<sup>+</sup> est obtenue en diluant la solution mère d'ABTS<sup>+</sup> avec le méthanol jusqu'à obtention d'une absorbance d'environ 0.700 ± 0.020 à 734 nm avant l'usage. L'ajout d'un antioxydant va réduire ce radical et provoquer la décoloration du mélange. En effet, une prise de 160 µl de la solution d'ABTS<sup>+</sup> a été additionnée à 40µl de la solution de l'extrait de plante à différentes concentrations (soit : 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 et 200 µg /ml pour les extraits d'acétate d'éthyle et aqueux d'*Euphorbia granulata*, 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 et 100 µg /ml pour les extraits méthanolique d'*Euphorbia granulata* et 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 et 400 µg /ml pour les extraits d'*Euphorbia retusa*). Après 10 min, l'absorbance a été mesurée à 734 nm. Les pourcentages d'inhibition ont été calculés pour chaque concentration par rapport à l'absorbance du blanc (sans extrait). La capacité de piégeage de l'ABTS<sup>•+</sup> a été calculée selon la réaction suivante :

$$PI\% = (A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{Extrait}} / A_{\text{Contrôle}}) \times 100$$

- A<sub>Contrôle</sub> est l'absorbance de la réaction témoin contenant tous les réactifs à l'exception de l'extrait.
- A<sub>Extrait</sub> est l'absorbance de la réaction contenant de l'extrait.

Le 2,6-di-t-butyl-4-méthylphenol ou butylhydroxytoluène (BHT) et le butylhydroxyanisole BHA sont utilisés comme des normes antioxydantes pour la comparaison de l'activité de nos extraits.

#### 5.2.4. Test de l'activité de métal chélation

Cette activité est testée uniquement sur les extraits d'*E. granulata*. L'activité de métal chélate est déterminée par la méthode de Decker and Welch (1990). En effet, une prise de 50 µl de Sulfate de fer FeSO<sub>4</sub> (500 µM) et 110µl de Tris-HCl (pH 7.4, 0.1 M) sont ajoutées à 10 µl d'extrait de différentes concentrations (12.5, 25, 50, 100, 200, 400 et 800 µg /ml). Après incubation à l'obscurité pendant 10 min, on ajoute 30 µl de phenanthroline (0.25%). La lecture est lue à 510 nm.

$$PI\% = (A_{\text{Controle}} - A_{\text{Extrait}} / A_{\text{Controle}}) \times 100$$

- $A_{\text{Controle}}$  est l'absorbance de l'échantillon dépourvu de l'extrait
- $A_{\text{Extrait}}$  est l'absorbance de l'échantillon en présence de l'extrait

EDTA (Éthylènediaminetétraacétique) est utilisé comme une norme antioxydante pour la comparaison de l'activité de nos extraits.

### 5.2.3. Test de blanchissement du $\beta$ -carotène

L'activité de blanchissement du  $\beta$ -carotène est mesurée uniquement pour les extraits d'*E. retusa*. Cette activité a été déterminée selon la méthode de Marco (1968). La solution de  $\beta$ -carotène est préparée comme suit: une prise de 0.5 mg de  $\beta$ -carotène dissolue dans 1 ml de chloroforme. On additionne 25  $\mu$ l de l'acide linoléique et 200 mg de Tween 40. Après évaporation complète au rotavapeur, 50 ml de l'eau saturée en oxygène (barboter à l'oxygène pendant 30 min avec un débit de 100 ml/min) sont ajoutés. Dans des microplaques de 96 puits, 160  $\mu$ l d'émulsion de la solution de  $\beta$ -carotène sont additionnés à 40  $\mu$ l d'extrait végétal de différentes concentrations (6.25, 2.5, 25, 50, 100, 200 et 400  $\mu$ g /ml). La lecture est réalisée à 0 mn. Après incubation à 45°C pendant 120 mn une deuxième lecture est lue à 470 nm par le lecteur de microplaques.

L'activité antioxydante a été exprimée en  $CI_{50}$  et en pourcentage d'inhibition.

$$PI \% = [1 - (A_{0 \text{ Extrait}} - A_{t \text{ Extrait}}) / (A_{0 \text{ Controle}} - A_{t \text{ Controle}})] \times 100$$

$A_{0 \text{ Extrait}}$ : valeur de l'absorbance de la  $\beta$ -carotène en présence de l'extrait mesurée à  $t=0$ ;

- $A_{0 \text{ Controle}}$ : valeur de l'absorbance de la  $\beta$ -carotène en présence de contrôle négatif mesurée à  $t=0$ ;
- $A_{t \text{ Extrait}}$ : valeur de l'absorbance de la  $\beta$ -carotène en présence de l'extrait mesurée à  $t=120$  mn;
- $A_{t \text{ Blanc}}$ : valeur de l'absorbance de la  $\beta$ -carotène en présence de contrôle négatif mesurée à  $t=120$  mn.

Le 2,6-di-t-butyl-4-méthylphenol ou butylhydroxytoluène (BHT) est utilisé comme un témoin pour la comparaison de l'activité de nos extraits.

#### 5.2.4. Le pouvoir réducteur de l'ion ferrique

L'activité réductrice du fer de nos extraits est déterminée selon la méthode décrite par Oyaizu (1986). Elle est basée sur la réduction du  $\text{Fe}^{3+}$  présent dans le complexe  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  de couleur jaune en  $\text{Fe}^{2+}$  de couleur bleu (Hamidi, 2013). Le mécanisme est connu comme étant un indicateur de l'activité donatrice d'électrons. En effet, une prise de 10  $\mu\text{l}$  de différentes concentrations (3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 et 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pour les extraits d'*Euphorbia granulata* et 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 et 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pour les extraits d'*Euphorbia retusa*) est mélangé avec 40  $\mu\text{l}$  de la solution tampon phosphate (0.2 M; pH 6.6) et 50  $\mu\text{l}$  de ferricyanure de potassium  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  à 1%. Le mélange est incubé à 50°C pendant 20 min. Après on ajoute 50  $\mu\text{l}$  de l'acide trichloracétique (TCA) (10%), 40  $\mu\text{l}$  de l'eau distillée et 10  $\mu\text{l}$  de ferric chloride  $\text{FeCl}_3$  (0.1%).

L'absorbance est mesurée à 700 nm. Les résultats sont exprimés en absorbance et en  $A_{0.5}$  ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) correspondant à la concentration indiquant l'absorbance 0.50.

L'acide ascorbique et l' $\alpha$ -Tocopherol sont des contrôles utilisés pour comparer les extraits d'*E. granulata*. Par contre, les résultats des extraits d'*E. retusa* sont comparés avec le 2,6-di-*t*-butyl-4-méthylphenol ou butylhydroxytoluène (BHT), le butylhydroxyanisole BHA et l'acide ascorbique.

#### 5.2.5. La réduction cuprique (Cupric reducing antioxidant capacity: CUPRAC)

L'activité antioxydante par la réduction cuprique des extraits est déterminée par la méthode d'Apak et al. (2004). Cette méthode est basée sur la formation d'un complexe entre neocuproïne et cuivre (I) en présence des antioxydants et par conséquent la réduction de  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^+$  Tel et al. (2012). En effet; une prise de 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{Cu}(\text{II})$  (10 mM), 50  $\mu\text{l}$  de neocuproïne (7.5 mM) et 60  $\mu\text{l}$  de tampon  $\text{ACNH}_4$  (1 M, pH = 7) sont ajoutée à 40  $\mu\text{l}$  d'extrait à différentes concentrations (soit: 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 et 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pour les extraits d'*Euphorbia granulata* et 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 et 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pour les extraits d'*Euphorbia retusa*). Après une heure du temps, l'absorbance a été enregistrée contre un blanc à 450 nm. Les résultats sont exprimés en absorbance et en  $A_{0.5}$  ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) correspondant à la concentration indiquant l'absorbance 0.50.

Le 2,6-di-*t*-butyl-4-methylphenol (BHT) et le butylhydroxyanisole BHA sont utilisés comme des normes antioxydantes pour la comparaison de nos résultats.

### 5.3. Facteur de protection solaire : Sun protection factor (SPF)

Les extraits bruts d'acétate d'éthyle et méthanolique d'*E.retusa* ont été dilués dans le méthanol et les extraits aqueux sont dilués dans l'eau distillée pour obtenir une concentration de 2 mg/ml. L'absorbance a été effectuée à des longueurs d'onde comprises entre 290 et 320 nm avec des intervalles de 5 nm et la valeur du SPF est calculée par l'application de l'équation mathématique de Mansur et al. (1986).

$$\text{SPF: } CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times (\lambda) \times \text{Abs}(\lambda)$$

**EE:** effet érythémogène (erythemogenic effect). (Annexe 1)

**I:** l'intensité du rayonnement (the radiation intensity). (Annexe 1)

**Abs:** absorbance d'extrait. (Annexe 3)

**CF:** facteur de correction (=10) (correction factor).

### 5.4. La chromatographie à haute performance en phase liquide (CLHP)

L'analyse chromatographique a été réalisée au laboratoire des Plantes Aromatiques et Médicinales (PAM) du Borj-Cedria (Tunisie).

La chromatographie CLHP utilisée dans l'identification des extraits est de type (Agilent 1260, Agilent Technologies, Germany) à pompe binaire avec une pression maximale de 400 bars, une colonne C18 (4.6 m × 100 mm) de porosité 3.5 μm (Zorbax Eclipse XDB C18). La phase mobile est constituée par un mélange de solvant A (Méthanol) et B (0.1% acide formique).

#### a- Principe

La chromatographie est une méthode physique d'analyse basée sur la séparation de constituants d'un mélange (solutés). Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Les différents composants de l'échantillon ont généralement une affinité différente pour l'une et l'autre des deux phases (Benabdallah, 2016). Le liquide traversait la phase stationnaire par gravité sous faible pression dans un tube appelé colonne chromatographique. Puis pour augmenter le débit, des manipulations ont été réalisées sous pression plus forte.

C'est ce que l'on a appelé la chromatographie liquide sous haute pression (HPLC). En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.

### **b- Préparation des solutions**

Sept extraits ont été analysés par l'HPLC (Trois extraits d'*E.granulata* et quatre extraits méthanoliques d'*E. retusa* à savoir : graines, capsules, tiges et feuilles). Le choix des extraits est basé généralement sur le rendement élevé de ces extraits. En effet, une prise de 50 milligramme d'extrait d'acétate d'éthyle de la partie aérienne d'*E.granulata* et d'extrait méthanolique des graines d'*E.retusa* pour chacun est dissoute dans un volume de 2 ml de méthanol. Par contre une quantité de 100 mg a été pris pour les autres extraits (100 mg d'extrait dans 2ml de méthanol), puis les échantillons filtrées à travers d'un filtre millipore de 0.45  $\mu\text{m}$ .

### **c- Mode opératoire**

Les extraits analysés ont été hydrolysés selon la méthode de Proestos et al. (2006). Le volume de l'injection est de 20  $\mu\text{l}$ . La séparation d'extrait méthanolique de la partie aérienne d'*E. granulata* a été réalisée à une température ambiante sous un débit de 0.4 ml / min selon le gradient d'élution: 0-5 min, 10-20% A; 5-10 min, 20-30% A; 10-30 min, 30-50% A; 30-40 min, 50-60% A; 40-45 min, 60-70% A; 45-50 min, 70-90% A; 50-55min, 90-50%; 55-60min (extrait très concentré). Par contre, la séparation des autres extraits a été réalisée avec un gradient d'élution: 0-5 min, 10-20% A; 5-10 min, 20-30% A; 10-15 min, 30-50% A; 15-20 min, 50-70% A; 20-25 min, 70-90% A; 25-30 min, 90-50% A; 30-35 min. Les pics sont examinés à 280 nm et sont identifiés en fonction du temps de rétention comparés à ceux des 37 standards de composés phénoliques d'acides phénoliques et de flavonoïdes (Annexe 3).

**NB** : Les extraits méthanoliques et les extraits d'acétate d'éthyle ont été dilués dans le méthanol et les extraits aqueux sont dissous dans l'eau distillée.

## **6. Traitement des données statistiques**

Les résultats expérimentaux sont exprimés selon la moyenne des valeurs obtenues  $\pm$  l'écart type (SD). Les valeurs de  $CI_{50}$  et  $A_{0.50}$  sont calculées par la méthode de régression



linéaire à partir de la courbe (% inhibition =  $f$  concentrations). Les données recueillies ont fait l'objet d'une analyse de la variance (ANOVA) en utilisant STATISTICA 6. La comparaison des moyennes est effectuée à l'aide du test de NEWMAN ET KEULS au seuil de 5%.

### Chapitre III. Résultats

La présente étude porte sur l'évaluation de la teneur en composés phénoliques (polyphénols et flavonoïdes totaux) et leurs activités antioxydantes des extraits secs de la partie aérienne d'*Euphorbia granulata* et cinq organes d'*Euphorbia retusa* (racines, tiges, feuilles, capsules et graines). Comme nous l'avons signalé précédemment (cf: Mat & Med, p 35) les difficultés rencontrés en matériel biologique nous ont contraint d'utiliser uniquement la partie aérienne pour *Euphorbia granulata*, contrairement pour *Euphorbia retusa* nous avons collectés cinq organes. Par ailleurs, les composés phénoliques de chaque échantillon ont été extraits par le soxhlet en utilisant séparément quatre solvants: hexane acétate, d'éthyle, méthanol et eaux distillée dont les extraits d'hexane ne sont pas pris en considération dans cette étude puisque il est utilisé pour éliminer les lipides, les caroténoïdes et les chlorophylles. Les solvants sont évaporés par le rota vapeur pour obtenir des extraits secs. Donc, le totale des extraits est 18 extraits. Dans un premier temps et à l'aide d'un lecteur de microplaque, une comparaison des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux de ces espèces a été réalisée. De plus, la complexité de la composition chimiques des extraits implique d'utiliser plusieurs méthodes pour évaluer les activités antioxydantes des plantes (Tel et *al.*, 2012). Pour cela, cinq tests ont été utilisé dans ce travail pour déterminer le pouvoir antioxydant des extraits d'*E. granulata* et d'*E. retusa*. En outre, une activité biologique du facteur de protection solaire a été déterminée sur les extraits d'*E. retusa*. Dans cette partie, des comparaisons ont été réalisées entre les résultats des extraits d'*E. granulata* et les résultats des extraits d'*E. retusa* a fin de montrer le meilleur extrait.

D'autre par, différents auteurs ont été utilisés de l'CLHP avec un détecteur à barrette diodes (DAD) pour caractériser la composition phénolique des plantes (Falleh et *al.*, 2012 b; Karoune et *al.*, 2016; Karoune et *al.*, 2015; Ksouri et *al.*, 2009). Nous avons aussi utilisé la chromatographie par (HPLC - DAD) pour identifier les composés phénoliques des extraits méthanoliques de la partie aérienne d'*E. granulata*, des graines et des capsules d'*E. retusa*.

## 1. Variations des teneurs en composés phénoliques et des activités antioxydantes d' *E. granulata*

### 1.1. Détermination des composés phénoliques

#### 1.1.1. Teneur en polyphénols totaux

Les résultats de la teneur des polyphénols totaux obtenus sont exprimés en microgramme, équivalent acide gallique par milligramme d'extrait sec ( $\mu\text{g}$  EAG/mg ES) à l'aide d'une courbe d'étalon avec une équation de la régression linéaire:  $y = 0.003x+0.104$  ( $R^2=0.997$ ).

Les résultats obtenus ont montré une variabilité très hautement significative de la teneur en polyphénols totaux entre les trois extraits d'*E. granulata* (tableau 5). En effet l'extrait méthanolique est le plus riche en polyphénols totaux ( $316.22\pm 6.29$   $\mu\text{g}$  EAG/ mg ES).

#### 1.1.2. Teneur en flavonoïdes totaux

Les résultats de la teneur en flavonoïdes totaux obtenus sont exprimés en termes d'équivalent de la quercétine à l'aide d'une courbe d'étalonnage dont,  $y = 0.004x+0.016$  ( $R^2 = 0.998$ ). Les valeurs de la teneur en flavonoïdes sont hétérogènes entre les trois extraits, dont identiquement à la teneur en polyphénols l'extrait méthanolique est le meilleur extrait avec une teneur de  $40.92\pm 3.99$   $\mu\text{g}$  EQ/ mg ES, tandis que l'extrait d'acétate d'éthyle est pauvre en flavonoïdes soluble dans l'acétate d'éthyle (tableau 5).

**Tableau 5:** Teneurs en polyphénols totaux (exprimées en  $\mu\text{g}$  EAG/ mg ES) et en flavonoïdes (exprimées en  $\mu\text{g}$  EQ/ mg ES) dans les extraits secs de la partie aérienne d'*E. granulata*.

Extrait sec	Teneur en polyphénols totaux $\mu\text{g}$ EAG/ mg ES	Teneur en flavonoïdes totaux $\mu\text{g}$ EQ/ mg ES
Acétate d'éthyle	$56.55\pm 2.83^c$	-
Méthanol 70%	$316.22\pm 6.29^a$	$40.92\pm 3.99^a$
Aqueux	$283.78\pm 4.71^b$	$35.08\pm 3.99^b$

Les valeurs dans chaque colonne sont significativement différentes à  $P<0.05$ .

## 1.2. Evaluation du potentiel antioxydant des composés phénoliques

Les résultats de pourcentage d'inhibition des concentrations testés (PI%) de l'activité antiradicalaire (DPPH), le piégeage du radical-cation ABTS<sup>•+</sup> et l'activité du métal chélate sont présentés dans la figure 17. Par ailleurs, le pourcentage d'inhibition de l'activité antiradicalaire et le piégeage du radical-cation ABTS<sup>•+</sup> d'extrait d'acétate d'éthyle et d'extrait aqueux avec les standards BHT et BHA est testé entre 200 et 3.125 µg/ml. Lorsque, il ya une saturation au niveau des concentrations 200 et 100 µg/ml pour l'extrait méthanolique, nous avons diminués les concentrations entre 100 à 1.5625 µg/ml. En outre, la concentration d'extrait nécessaire pour diminuer 50 % du taux des radicaux libres (DPPH<sup>•+</sup> et ABTS<sup>•+</sup>) (tableau 6 et 7) et chélater les ions ferreux (tableau 6) est estimée en  $CI_{50}$  (µg/ml). En outre, la capacité antioxydante à une absorbance 0.5 du pouvoir réducteur et de CUPRAC est estimée en  $A_{0.5}$  (µg/ml) (tableau 8). L'analyse statistique des résultats de ces paramètres montre qu'il y a une différence très hautement significative entre les extraits.

### 1.2.1. Activité antiradicalaire

La comparaison des profils de l'activité antiradicalaire a montré que l'extrait aqueux possède une activité plus importante que celle du standard BHT et cela à des concentrations supérieures à 12.5 µg/ml. Ainsi, le pourcentage d'inhibition d'extrait méthanolique est plus élevé que celui des standards BHA et BHT à des concentrations supérieures à 25 µg/ml. (figure 17). Par ailleurs, la concentration d'extrait méthanolique nécessaire pour diminuer 50 % du taux des radicaux libres ( $13.21 \pm 0.09$  µg/ml) est plus importante par rapport aux deux extraits aqueux et d'acétate d'éthyle ( $15.42 \pm 0.14$  et  $147.64 \pm 8.92$  µg/ml, respectivement). En plus, l'activité antiradicalaire (test DPPH) des deux extraits méthanolique et aqueux s'est avérée plus importante que celle du témoin positif (BHT) ( $22.32 \pm 1.19$  µg/ml) (tableau 6 et 7).

### 1.2.2. Piégeage du radical-cation ABTS<sup>•+</sup>

Concernant l'activité inhibitrice du radical-cation ABTS<sup>•+</sup>, l'extrait méthanolique présente des pourcentages d'inhibitions plus importantes par rapport aux deux autres extraits entre 3.125 et 100 µg/ml (figure 17). En outre, à 25 et 50 µg/ml l'extrait méthanolique est plus actif que le standard BHT et BHA. Donc, l'extrait méthanolique est l'inhibiteur le plus puissant du radical ABTS<sup>•+</sup> ( $CI_{50} = 10.61 \pm 0.50$  µg/ml) (tableau 7).

### 1.2.3. Activité de métal chélation

Du 50 à 400 µg/ml l'extrait aqueux présente un pourcentage élevé de chélater les ions ferreux (figure 18) que les autres extraits. En outre, la capacité des extraits nécessaire à la chélation de 50% des ions ferreux a été comparée par rapport à la capacité du standard EDTA (tableau 6). Cette activité est plus élevée chez l'extrait aqueux ( $CI_{50} = 47.23 \pm 3.71$  µg/ml) que l'extrait méthanolique et l'extrait d'acétate d'éthyle ( $CI_{50} = 226.55 \pm 4.12$  et  $386.69 \pm 6.25$  µg/ml, respectivement). Néanmoins, l'activité de l'EDTA est plus forte que non résultats.

**Tableau 6.** Activité antioxydante contre le radical DPPH<sup>\*</sup>, le radical ABTS<sup>\*</sup>(Les concentrations entre 3.125 et 200 µg /ml ) et les ions chélates exprimée en  $CI_{50}$  (µg /ml) des extraits secs de la partie aérienne d'*E. granulata*.

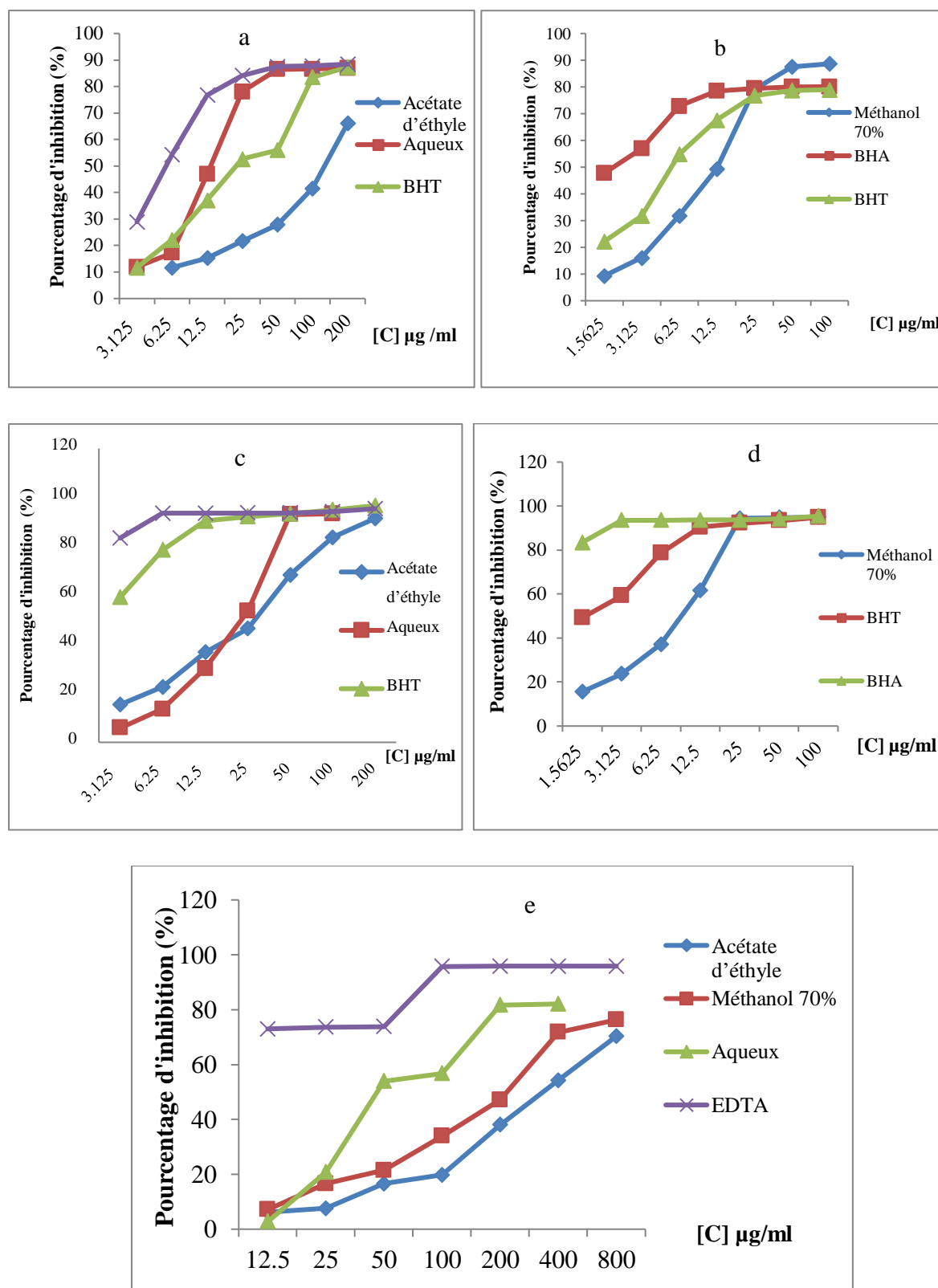
Activité Extrait sec	DPPH <sup>*</sup>	ABTS <sup>*</sup>	Ions chélates
Acétate d'éthyle	147.64±8.92 <sup>c</sup>	28.53±0.98 <sup>c</sup>	386.69±6.25 <sup>d</sup>
Méthanol 70%	-	-	226.55±4.12 <sup>c</sup>
Aqueux	15.42±0.14 <sup>b</sup>	23.75±0.98 <sup>b</sup>	47.23±3.71 <sup>b</sup>
BHT	22.32±1.19 <sup>b</sup>	<3.125 <sup>a</sup>	-
BHA	5.73±0.41 <sup>a</sup>	<3.125 <sup>a</sup>	-
EDTA	-	-	8.80±0.47 <sup>a</sup>

Les valeurs dans chaque colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes à  $P < 0.05$ . BHA: butylatedhydroxyl anisole; BHT: butylated hydroxytoluene. EDTA : Éthylène diamine tétra acétique.

**Tableau 7.** Activité antioxydante contre le radical DPPH<sup>•</sup> et le radical ABTS<sup>•</sup> exprimé en CI<sub>50</sub> (µg /ml) d'extrait méthanolique sec de la partie aérienne d'*E. granulata*. (Les concentrations entre 1.5625 et 100 µg /ml).

<b>Extrait sec</b>	<b>Méthanol 70%</b>	<b>BHT</b>	<b>BHA</b>
<b>Activité</b> <b>(CI<sub>50</sub> µg/ml)</b>			
<b>DPPH<sup>•</sup></b>	13.21±0.09 <sup>b</sup>	-	6.82±0.49 <sup>a</sup>
<b>ABTS<sup>•</sup></b>	10.61±0.50 <sup>c</sup>	1.59±0.03 <sup>b</sup>	<1.5625±0.00 <sup>a</sup>

Les valeurs dans chaque ligne sont significativement différentes à  $P < 0.05$ . BHA: butylatedhydroxyl anisole; BHT: butylated hydroxytoluene.



**Figure 16:** Profils des pourcentages d'inhibitions des activités antioxydantes; a et b : Activité antiradicalaire (test DPPH), c et d: activité antiradicalaire (test ABTS<sup>•+</sup>), e : Activité du métal chélate des extraits secs de la partie aérienne d'*E. granulata* et des standards utilisés. BHA: butylatedhydroxyl anisole BHT: butylated hydroxytoluene. EDTA: Éthylènediaminetétraacétique.

### 1.2.4. Pouvoir réducteur du fer

La capacité réductrice du fer dans cette étude est évaluée par l'absorbance de chaque concentration (figure 18) et aussi par le calcul de la concentration à une absorbance de 0.5 [ $A_{0.50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ )] (tableau 8). Les valeurs de la densité optique du pouvoir réducteur à des concentrations inférieure à 100  $\mu\text{g/ml}$  reflète que l'extrait méthanolique avec  $A_{0.50} = 18.22 \pm 0.85 \mu\text{g/ml}$  présente une activité importante pour réduire le fer par rapport à celle des deux autres extraits et le standard de référence  $\alpha$ -Tocopherol. Par contre, à la concentration 200  $\mu\text{g/ml}$  le standard  $\alpha$ -Tocopherol et l'extrait aqueux ( $DO = 1.81 \pm 0.09$  et  $1.80 \pm 0.07$ , respectivement) montrent une activité beaucoup plus prononcée pour réduire le fer par rapport à l'extrait methanolique, l'extrait d'acétate d'éthyle et l'acide ascorbique ( $DO = 1.69 \pm 0.15$ ,  $0.63 \pm 0.17$  et  $1.44 \pm 0.21$ , respectivement).

### 1.2.5. L'activité antioxydante par la réduction du cuivre (CUPRAC)

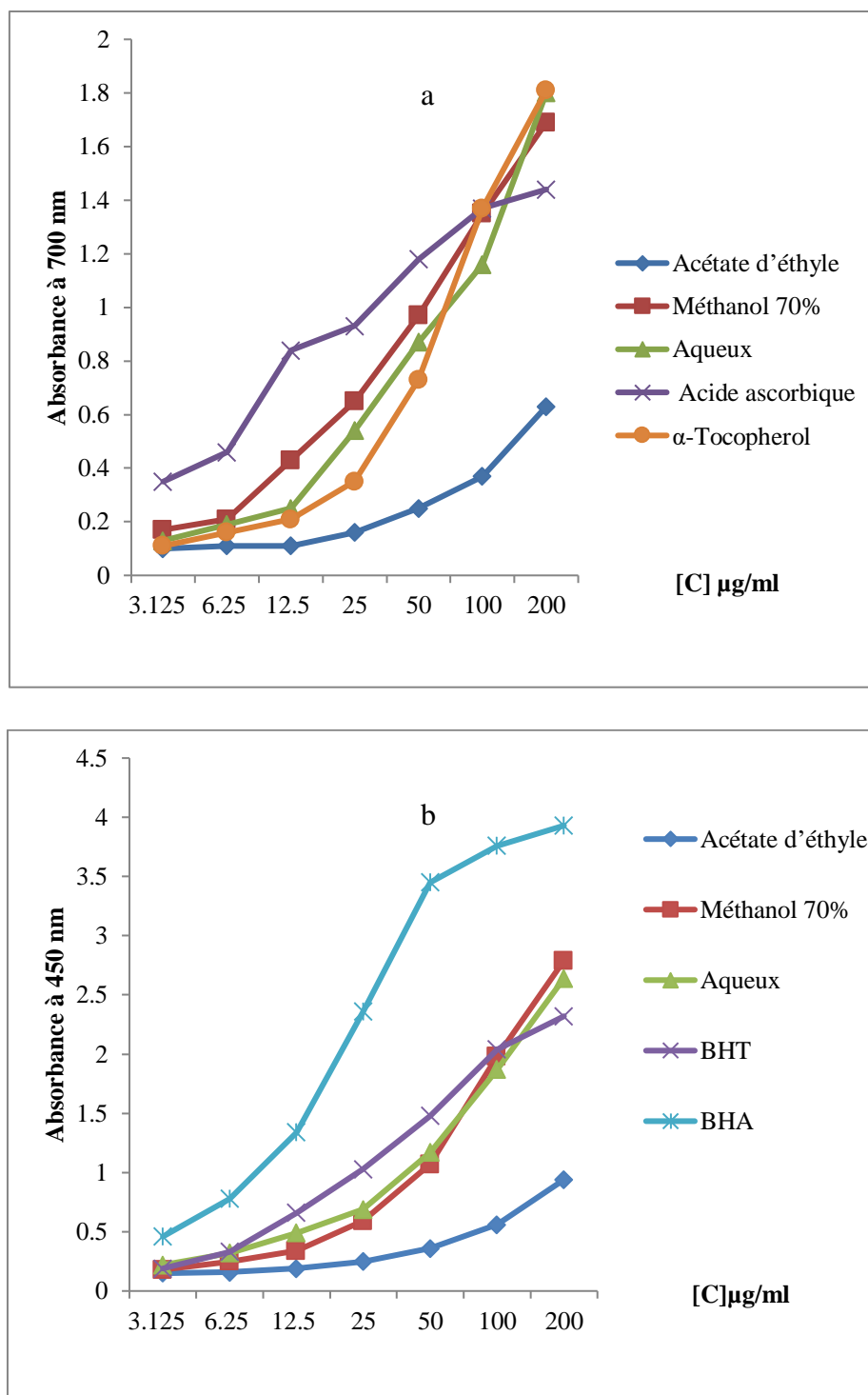
Pour l'activité réductrice du cuivre, l'extrait aqueux souligne une activité plus importante ( $A_{0.50} = 15.09 \pm 0.85 \mu\text{g/ml}$ ) (tableau 8) par rapport aux autres extraits (figure 18). De plus, cet extrait présente une forte activité  $DO = 2.64 \pm 0.13$  que celle du témoin positif (BHT) à 200  $\mu\text{g/ml}$  dont la valeur de la DO est  $2.32 \pm 0.28$  (figure 20). Les valeurs de  $CI_{50}$  varient largement entre les extraits et les standards de comparaison.

**Tableau 8.** L'activité antioxydante par le pouvoir réducteur du fer et la réduction du cuivre (CUPRAC) exprimée en  $A_{0.50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) des extraits secs de la partie aérienne d'*E. granulata*.

Extrait sec	Pouvoir réducteur du fer	CUPRAC
Acétate d'éthyle	$144.17 \pm 5.42^e$	$112.92 \pm 0.82^c$
Méthanol 70%	$18.22 \pm 0.85^b$	$21.08 \pm 1.54^d$
Aqueux	$26.40 \pm 1.04^c$	$15.09 \pm 0.85^c$
BHT	-	$9.62 \pm 0.87^b$
BHA	-	$3.64 \pm 0.19^a$
Acide ascorbique	$06.77 \pm 1.51^a$	-
$\alpha$ -Tocopherol	$34.93 \pm 2.38^d$	-

Les valeurs dans chaque colonne sont significativement différentes à  $P < 0.05$ . BHA: butylatedhydroxyl anisole. BHT: butylated hydroxytoluene

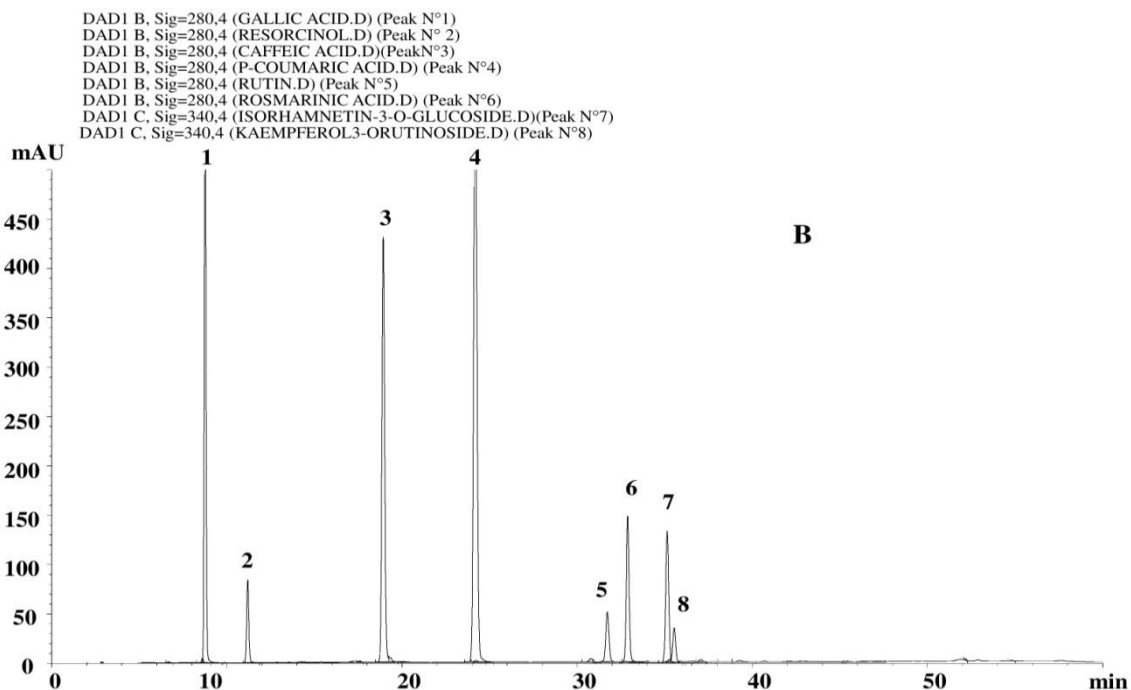
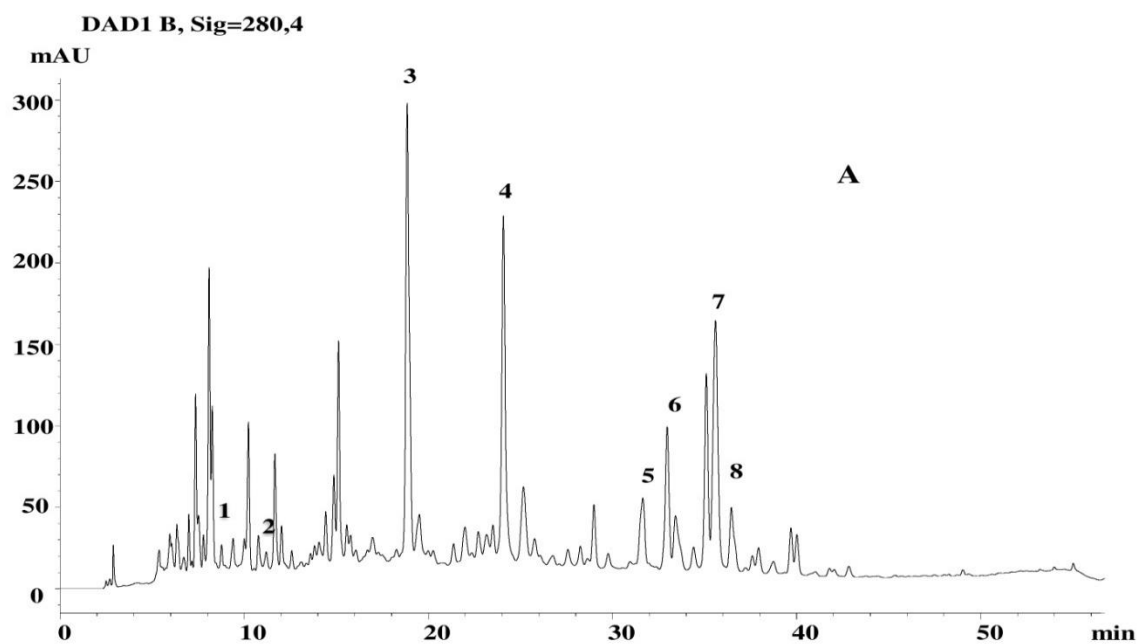




**Figure 17:** Profils d'absorbance du pouvoir réducteur du fer (a) et de la réduction du cuivre (CUPRAC) (b) des extraits secs de la partie d'*E. granulata* et des standards utilisés. BHA: butylatedhydroxyl anisole. BHT: butylated hydroxytoluene. α-Tocopherol

### 1.3. Caractérisation phytochimique par Chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

Le chromatogramme enregistré d'extrait méthanolique de la partie aérienne d'*E. granulata* montre un massif assez résolu entre 2.5 et 26 min car le profil d'élution se distingue par une augmentation de la ligne de base sur cet intervalle. Les profils CLHP représentés dans la figure 19 montrent des composés mentionnés par leurs pics et leurs temps de rétention dans les spectres d'extrait analysé. La comparaison des temps de rétention et des caractéristiques spectrales avec les standards de référence a permis d'identifier 8 composés phénoliques, il s'agit de quatre acides phénoliques (acide gallique, acide caféique, acide p-coumarique et acide rosmarinique) et quatre flavonoïdes (Résorcinol, Rutine, Isorhamnetin-3-o-glucoside, kaempférol-3-orutinoside), dont l'acide caféique est le composé majoritaire suivi par l'acide p-coumarique (figure 19).



**Figure 18:** Chromatographique obtenue à 280 nm d'extrait méthanolique de la partie aérienne d'*E. granulata* (A), mélange de standards (B). Les numéros des pics correspondent à : 1- Acide gallique, 2- Resorcinol, 3- Acide caféique, 4- Acide p-coumarique, 5- Rutine, 6-Acide rosmarinique, 7- Isorhamnetin-3-o-glucoside, 8- kaempférol3-orutinoside.

## 2. Variations des teneurs en composés phénoliques, des activités antioxydantes et photoprotectives des organes d'*Euphorbia retusa*.

### 2.1. Détermination des composés phénoliques

#### 2.1.1. Teneur en polyphénols totaux

Les résultats de la teneur des polyphénols totaux obtenus sont exprimés en microgramme, équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait sec ( $\mu\text{g EGA}/\text{mg ES}$ ) en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique avec  $y = 0.002 x + 0.010$  et  $R^2 = 0.989$  (moyen de trois répétitions).

L'analyse des résultats obtenus indique une variabilité très hautement significative pour l'interaction entre chaque organe et la nature du solvant utilisé pour l'extraction (tableau 9).

En effet, l'extrait aqueux des graines et l'extrait d'acétate d'éthyle des capsules ont présenté des teneurs très proches en polyphénols ( $356.83 \pm 3.69$  et  $357.00 \pm 8.49$  EGA/ mg ES, respectivement) suivis par l'extrait méthanolique et l'extrait d'acétate d'éthyle des graines, dont le contenu est de ( $315.50 \pm 1.41$  et  $265.67 \pm 8.78$   $\mu\text{g EGA}/\text{mg ES}$ , respectivement). Les teneurs en composés phénoliques les plus faibles sont inférieures à  $105.33 \pm 7.75$   $\mu\text{g EGA}/\text{mg ES}$ .

En outre, l'effet du solvant est variable d'un organe à un autre dont, au niveau du même organe:

- L'extrait d'acétate d'éthyle des capsules possède des teneurs plus élevées par rapport aux autres extraits.
- L'extrait aqueux des graines et des racines présentes les meilleures teneurs en polyphénols totaux.
- L'extrait méthanolique des tiges et des feuilles donnent les valeurs les plus élevées des polyphénols totaux.

**Tableau 9:** Teneurs en polyphénols totaux (exprimées en  $\mu\text{g}$  EAG/ mg ES) dans les extraits secs des organes d'*E. retusa*.

solvant	Organes				
	Racines	Tiges	Feuilles	Capsules	Graines
<b>Acétate d'éthyle</b>	63.25±3.89 <sup>ijk</sup>	59.17±6.66 <sup>jk</sup>	54.25±2.47 <sup>k</sup>	357.00±8.49 <sup>a</sup>	265.67±8.78 <sup>c</sup>
<b>Méthanol 70%</b>	68.50±5.57 <sup>hij</sup>	91.00±2.83 <sup>f</sup>	84.33±6.66 <sup>fg</sup>	105.33±7.75 <sup>e</sup>	315.50±1.41 <sup>b</sup>
<b>Aqueux</b>	72.25±6.01 <sup>hi</sup>	71.50±1.41 <sup>hi</sup>	75.83±8.96 <sup>gh</sup>	114.25±0.35 <sup>d</sup>	356.83±3.69 <sup>a</sup>

Les valeurs dans les cellules suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes à  $P < 0.05$ .

### 2.1.2. Teneur en flavonoïdes totaux

Les résultats de la teneur en flavonoïdes totaux (tableau 10) obtenus sont exprimés en terme d'équivalent de la quercétine à l'aide d'une courbe d'étalonnage avec  $y = 0.004x + 0.016$  et ( $R^2 = 0.997$ ) pour les extraits méthanoliques d'*E. retusa*. Par contre, l'équation de calibrage des autres extraits est  $y = 0.006x - 0.006$  ( $R^2 = 0,998$ ). Les teneurs en flavonoïdes totaux varient considérablement entre les différents extraits. En effet; les deux extraits d'acétate d'éthyle et aqueux des graines se sont avérée être les plus riches en flavonoïdes totaux ( $206.75 \pm 0.53$  et  $194.38 \pm 8.31$  EQ/mg ES, respectivement), suivie de l'extrait d'acétate d'éthyle des capsules ( $169.38 \pm 5.13$   $\mu\text{g}$  EQ/ mg ES). Alors que, l'extrait méthanolique des racines et l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles sont pauvres en flavonoïdes totaux solubles dans les solvants d'extrait.

**Tableau 10:** Teneur en flavonoïdes totaux (exprimées en  $\mu\text{g}$  EQ/mg ES) dans les extraits secs des organes d'*E. retusa*.

Solvant	Organes				
	Racines	Tiges	Feuilles	Capsules	Graines
<b>Acétate d'éthyle</b>	10.00±1.06 <sup>i</sup>	7.81±0.44 <sup>i</sup>	-	169.38±5.13 <sup>c</sup>	206.75±0.53 <sup>a</sup>
<b>Méthanol 70%</b>	-	16.21±0.64 <sup>h</sup>	15.68±1.39 <sup>h</sup>	21.14±1.18 <sup>fg</sup>	87.27±5.36 <sup>d</sup>
<b>Aqueux</b>	17.88±1.94 <sup>h</sup>	55.75±4.04 <sup>e</sup>	40.25±2.60 <sup>f</sup>	24.50±2.65 <sup>g</sup>	194.38±8.31 <sup>b</sup>

Les valeurs dans les cellules suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes à  $P < 0.05$ .

## 2.2. Evaluation du potentiel antioxydant des composés phénoliques

### 2.2.1. Activité antiradicalaire

Les profils de l'activité antiradicalaire présentés dans la figure 20 montrent les pourcentages d'inhibition de chaque concentration (PI%). A partir de ces profils nous avons déduit la valeur correspondante à la  $CI_{50}$  (la concentration d'inhibiteur (antioxydant) nécessaire pour diminuer 50 % du taux des radicaux libres).

La comparaison des profils de l'activité antiradicalaire au niveau de chaque organe en fonction de la nature du solvant a montré que l'extrait d'acétate d'éthyle possède un pouvoir antioxydant plus important que les autres extraits chez: les graines à des concentrations supérieures à 12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  et les capsules pour toutes les concentrations. Par contre; l'extrait aqueux des feuilles et des tiges possèdent une activité importante par rapport aux autres extraits de chaque organe et cela à des concentrations supérieures à 6.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pour les feuilles et 12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pour les tiges. Ainsi, l'extrait aqueux des racines est le plus actif pour toutes les concentrations.

Indépendamment de la nature du solvant, la comparaison des résultats des profils de l'activité antiradicalaire des différents organes d'*E. retusa* a permis de distinguer que l'extrait aqueux des racines, les extraits d'acétate d'éthyle des graines et des capsules généralement présentent une activité importante.

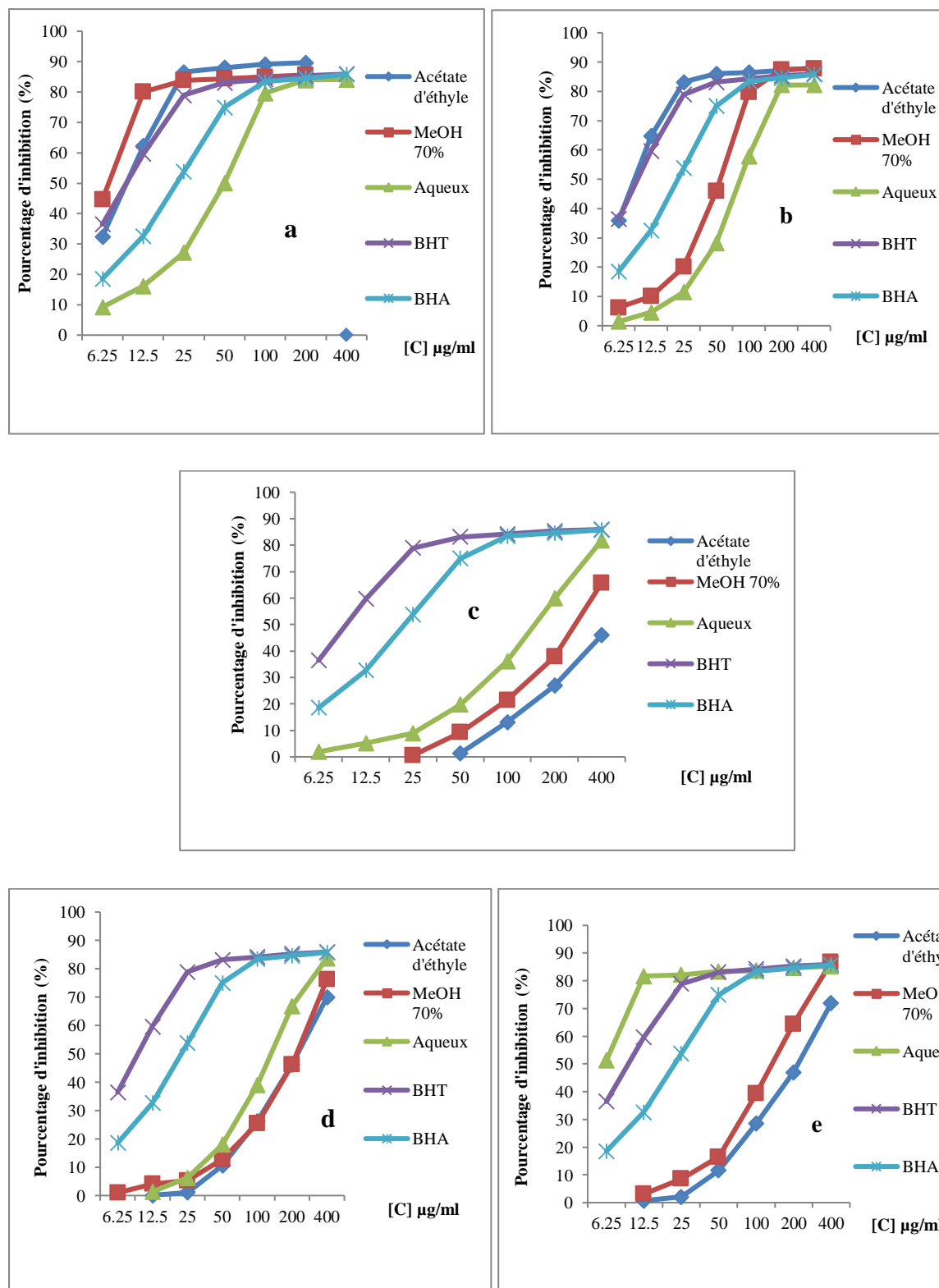
Par ailleurs, l'activité antiradicalaire met en évidence une grande variabilité des concentrations d'inhibition à 50% (CI<sub>50</sub>) concernant l'interaction entre les organes et les solvants (tableau 11). En effet, les extraits les plus actifs sont l'extrait aqueux des racines (CI<sub>50</sub> < 6.25 µg/ml) suivi par l'extrait méthanolique des graines et les deux extraits d'acétate d'éthyle des capsules et des graines (CI<sub>50</sub> = 7.20 ± 0.25, 9.01 ± 0.39 et 10.05 ± 1.10 µg/ml, respectivement) (groupe a). Aussi, l'activité antiradicalaire (test DPPH) de ces trois extraits s'est avérée plus importante que celle du témoin positif (BHT) avec CI<sub>50</sub> = 23.54µg/ml.

**Tableau 11.** Activité contre le radical DPPH exprimée en CI<sub>50</sub> µg /ml des extraits secs des organes d'*E. retusa*.

<b>Solvant</b>	<b>Acétate d'éthyle</b>	<b>Méthanol 70%</b>	<b>Aqueux</b>
<b>Organes</b>			
<b>Racines</b>	224.12±2.81 <sup>i</sup>	143.40±1.47 <sup>g</sup>	<6.25 <sup>a</sup>
<b>Tiges</b>	232.03±2.51 <sup>j</sup>	225.87±3.88 <sup>i</sup>	139.21±3.16 <sup>f</sup>
<b>Feuilles</b>	>400 <sup>l</sup>	287.52±2.92 <sup>k</sup>	158.49±3.24 <sup>h</sup>
<b>Capsules</b>	9.01±0.39 <sup>a</sup>	57.98±0.57 <sup>d</sup>	87.38±1.53 <sup>e</sup>
<b>Graines</b>	10.05±1.10 <sup>a</sup>	7.20±0.25 <sup>a</sup>	50.79±1.87 <sup>c</sup>
<b>BHA</b>	10.03±0.84 <sup>a</sup>	10.03±0.84 <sup>a</sup>	10.03±0.84 <sup>a</sup>
<b>BHT</b>	23.54±1.83 <sup>b</sup>	23.54±1.83 <sup>b</sup>	23.54±1.83 <sup>b</sup>

Les valeurs dans les cellules suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes à  $P < 0.05$ .

BHA: butylatedhydroxyl anisole; BHT: butylated hydroxytoluene



**Figure 19 :** Profils de l'activité antiradicalaire (test DPPH') des extraits secs des organes d'*E. retusa* et des standards utilisés. a : les graines; b : les capsules ; c : les feuilles ; d : les tiges ; e : les racines. BHA: butylatedhydroxyl anisole ; BHT : butylated hydroxytoluene



### 2.2.2. Piégeage du radical-cation ABTS<sup>•+</sup>

La figure 21 illustre les courbes caractéristiques du pourcentage d'inhibition du radical ABTS<sup>•+</sup> en fonction des concentrations des extraits secs d'*E. retusa*. A partir de ces courbes est déduite la CI<sub>50</sub>.

L'activité inhibitrice des extraits en fonction de la nature du solvant au niveau de chaque organe a montré que:

- L'extrait méthanolique des graines est plus actif à des concentrations  $\geq 50 \mu\text{g/ml}$ ;
- L'extrait d'acétate d'éthyle des capsules et l'extrait aqueux des tiges sont plus actifs pour toutes les concentrations;
- L'extrait aqueux des feuilles à des concentrations  $\geq 100 \mu\text{g/ml}$  et l'extrait aqueux des racines à des concentrations  $\geq 25 \mu\text{g/ml}$  sont plus actifs.

En outre, les trois extraits des graines sont plus inhibitrices du radical ABTS<sup>•+</sup> que le standard BHT à des concentrations  $\leq 200 \mu\text{g/ml}$ .

Indépendamment de la nature du solvant, l'activité inhibitrice entre les organes a montré que les graines présentent généralement une activité inhibitrice plus importante que les autres organes.

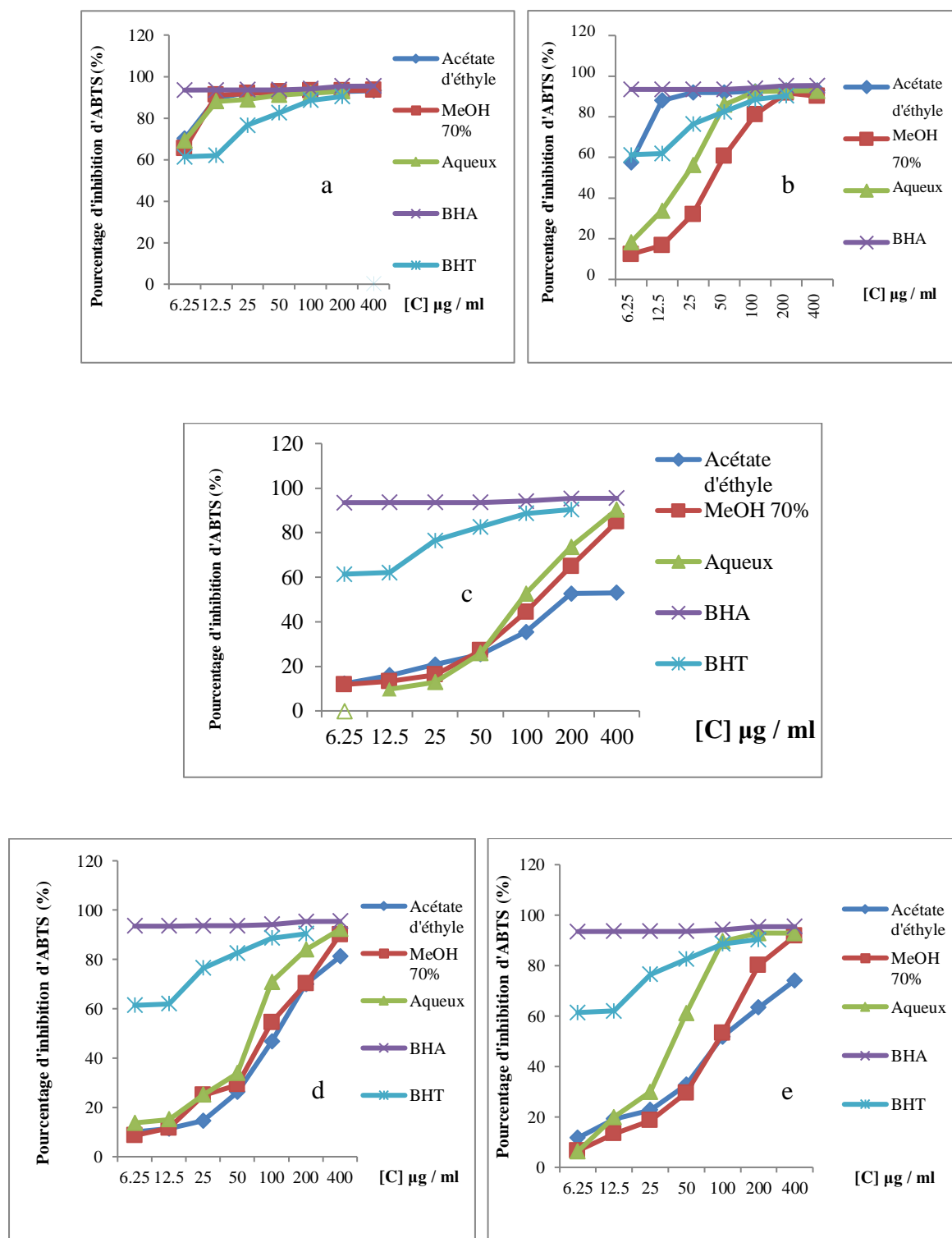
Les résultats de la capacité d'inhibition du radical ABTS<sup>•+</sup> exprimés en CI<sub>50</sub> comparativement à deux antioxydants de référence BHA et BHT sont présentés dans le tableau 12. En effet, les trois extraits des graines et l'extrait d'acétate d'éthyle des capsules présentent la meilleure capacité de neutraliser le radical ABTS<sup>•+</sup> (CI<sub>50</sub> < 6.25  $\mu\text{g/ml}$ ). Par contre, les activités les plus faibles c'est celles qui donnent des valeurs de CI<sub>50</sub> supérieures à 41.50  $\mu\text{g/ml}$  notamment les trois extraits des feuilles, les tiges et les extraits d'acétate d'éthyle et méthanolique des racines.

**Tableau 12:** Activité antiradicalaire (test ABTS<sup>•+</sup>) exprimée en CI<sub>50</sub> (µg/ml), des extraits secs des organes d'*E. retusa*.

<b>Solvant</b>	<b>Acétate d'éthyle</b>	<b>Méthanol 70%</b>	<b>Aqueux</b>
<b>Organes</b>			
<b>Racines</b>	96.37±3.64 <sup>f</sup>	93.58±3.34 <sup>ef</sup>	40.95±0.72 <sup>c</sup>
<b>Tiges</b>	113.46±1.20 <sup>g</sup>	91.45±1.33 <sup>e</sup>	70.12±0.23 <sup>d</sup>
<b>Feuilles</b>	184.67±0.44 <sup>i</sup>	126.75±3.83 <sup>h</sup>	95.92±1.20 <sup>f</sup>
<b>Capsules</b>	<6.25 <sup>a</sup>	41.47±3.15 <sup>c</sup>	21.12±0.76 <sup>b</sup>
<b>Graines</b>	<6.25 <sup>a</sup>	<6.25 <sup>a</sup>	<6.25 <sup>a</sup>
<b>BHA</b>	<6.25 <sup>a</sup>	<6.25 <sup>a</sup>	<6.25 <sup>a</sup>
<b>BHT</b>	<6.25 <sup>a</sup>	<6.25 <sup>a</sup>	<6.25 <sup>a</sup>

Les valeurs dans les cellules suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes à  $P < 0.05$ .

BHA: butylatedhydroxyl anisole; BHT: butylated hydroxytoluene.



**Figure 20:** Profils de l'activité antiradicalaire (test ABTS<sup>•+</sup>) des extraits secs des organes d'*E. retusa* et des standards utilisés. a : les graines; b : les capsules; c : les feuilles; d : les tiges; e : les racines. BHA: butylatedhydroxyl anisole ; BHT : butylated hydroxytoluene.

### 2.2.3. Activité inhibitrice du blanchiment de la $\beta$ -carotène

Les résultats obtenus de l'activité inhibitrice du blanchiment de la  $\beta$ -carotène des différents extraits en fonction de leurs concentrations sont représentées dans la figure 22 et les valeurs de  $CI_{50}$  ont été calculées par la suite et sont présentées dans le tableau 13. En effet, chez les feuilles l'extrait d'acétate d'éthyle est plus puissant que l'extrait méthanolique et aqueux de cet organe. Par contre, chez les autres organes, les extraits aqueux sont plus actifs que les extraits d'acétate d'éthyle et méthanolique.

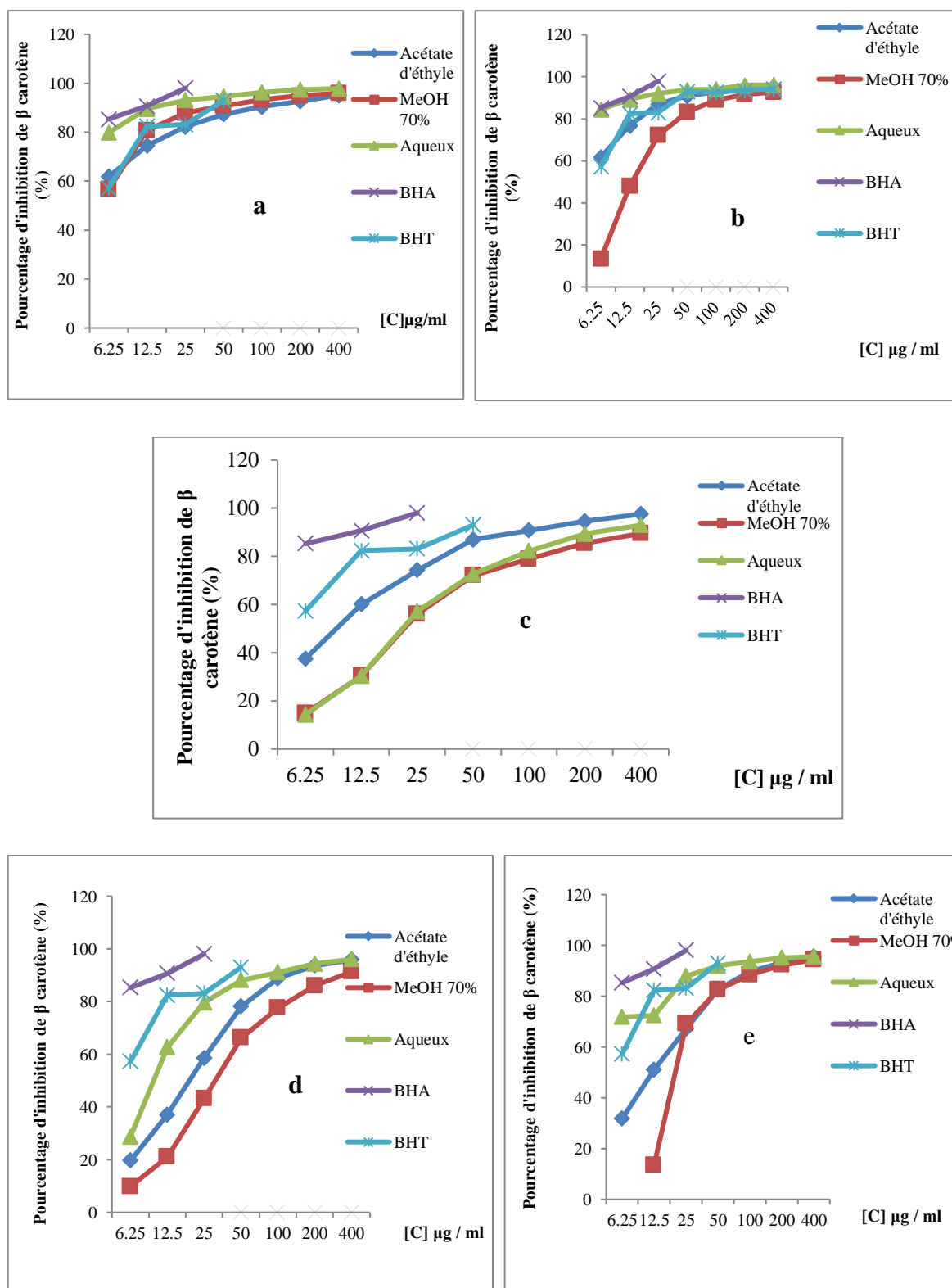
Par ailleurs, les valeurs de  $CI_{50}$  montrent que, l'extrait aqueux des racines, les trois extraits de graines, les extraits d'acétate d'éthyle et aqueux des capsules sont les inhibiteurs les plus puissants du blanchiment de la  $\beta$ -carotène. Tandis que, l'extrait méthanolique des tiges a donné l'activité la plus faible ( $CI_{50} = 33.04 \pm 1.99 \mu\text{g/ml}$ ).

**Tableau 13:** Activité inhibitrice du blanchiment de la  $\beta$ -carotène exprimée en  $CI_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ), des extraits secs des organes d'*E. retusa*.

Solvant Organes	Acétate d'éthyle	Méthanol 70%	Aqueux
<b>Racines</b>	12.16±0.24 <sup>b</sup>	23.16±0.40 <sup>g</sup>	<6.25 <sup>a</sup>
<b>Tiges</b>	21.31±0.15 <sup>c</sup>	33.04±1.99 <sup>e</sup>	11.31±0.72 <sup>b</sup>
<b>Feuilles</b>	10.17±0.40 <sup>b</sup>	23.93±0.23 <sup>d</sup>	23.82±0.95 <sup>d</sup>
<b>Capsules</b>	<6.25 <sup>a</sup>	17.50±0.37 <sup>f</sup>	<6.25 <sup>a</sup>
<b>Graines</b>	<6.25 <sup>a</sup>	<6.25 <sup>a</sup>	<6.25 <sup>a</sup>
<b>BHT</b>	<6.25 <sup>a</sup>	<6.25 <sup>a</sup>	<6.25 <sup>a</sup>

Les valeurs dans les cellules suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes à  $P < 0.05$ .

BHT: butylated hydroxytoluene



**Figure 21:** Profils de l'activité inhibitrice du blanchiment de la  $\beta$ -carotène des extraits secs des organes d'*E. retusa* et des standards utilisés. a : les graines; b : les capsules; c : les feuilles ; d : les tiges; e : les racines. BHA: butylatedhydroxyl anisole; BHT: butylated hydroxytoluene.

#### 2.2.4. Pouvoir réducteur du fer

La figure 23 illustre les courbes représentatives des valeurs de la densité optique des différents extraits en fonction de leurs concentrations. De ces courbes est déduite l'absorbance  $A_{0.50}$  correspondant à la concentration indiquant l'absorbance 0.5. La comparaison des profils du pouvoir réducteur au niveau de chaque organe en fonction de la nature du solvant a montré que, l'extrait d'acétate d'éthyle des capsules présente un pouvoir réducteur important par rapport aux autres extraits pour toutes les concentrations. En outre, l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles révèle des absorbances élevées que les autres extraits à des concentrations supérieures à 6.25  $\mu\text{g/ml}$ . Par contre, l'extrait de méthanol a donné des absorbances importantes chez les tiges et les racines. Par contre, chez les graines, l'extrait aqueux représente les absorbances les plus élevées pour toutes les concentrations.

Indépendamment de la nature du solvant, la comparaison des profils du pouvoir réducteur inter organes a montré que, les graines présentent des absorbances plus importantes par rapport aux autres organes.

Les résultats de la capacité de réduire du fer à l'absorbance 0.5 illustrés par le tableau 14, montrent une variabilité très hautement significative entre les extraits issus de l'interaction entre les organes d'*E.retusa* et la nature du solvant. En effet, les extraits aqueux et méthanolique des graines et les deux extraits d'acétate d'éthyle des graines et des capsules présentent les valeurs les plus élevées en  $A_{0.50}$  ( $A_{0.50} = 6.97 \pm 0.75$ ,  $11.84 \pm 1.72$ ,  $18.28 \pm 1.82$  et  $12.11 \pm 1.04$   $\mu\text{g/ml}$ , respectivement). Ces valeurs sont plus importantes que la capacité réductrice de BHT ( $A_{0.50} = 37.41 \pm 3.89$   $\mu\text{g/ml}$ ). Par contre les trois extraits des feuilles et des tiges et les extraits d'acétate d'éthyle et aqueux des racines présentent une activité réductrice faible et cela à des concentrations supérieures à 100  $\mu\text{g/ml}$ .

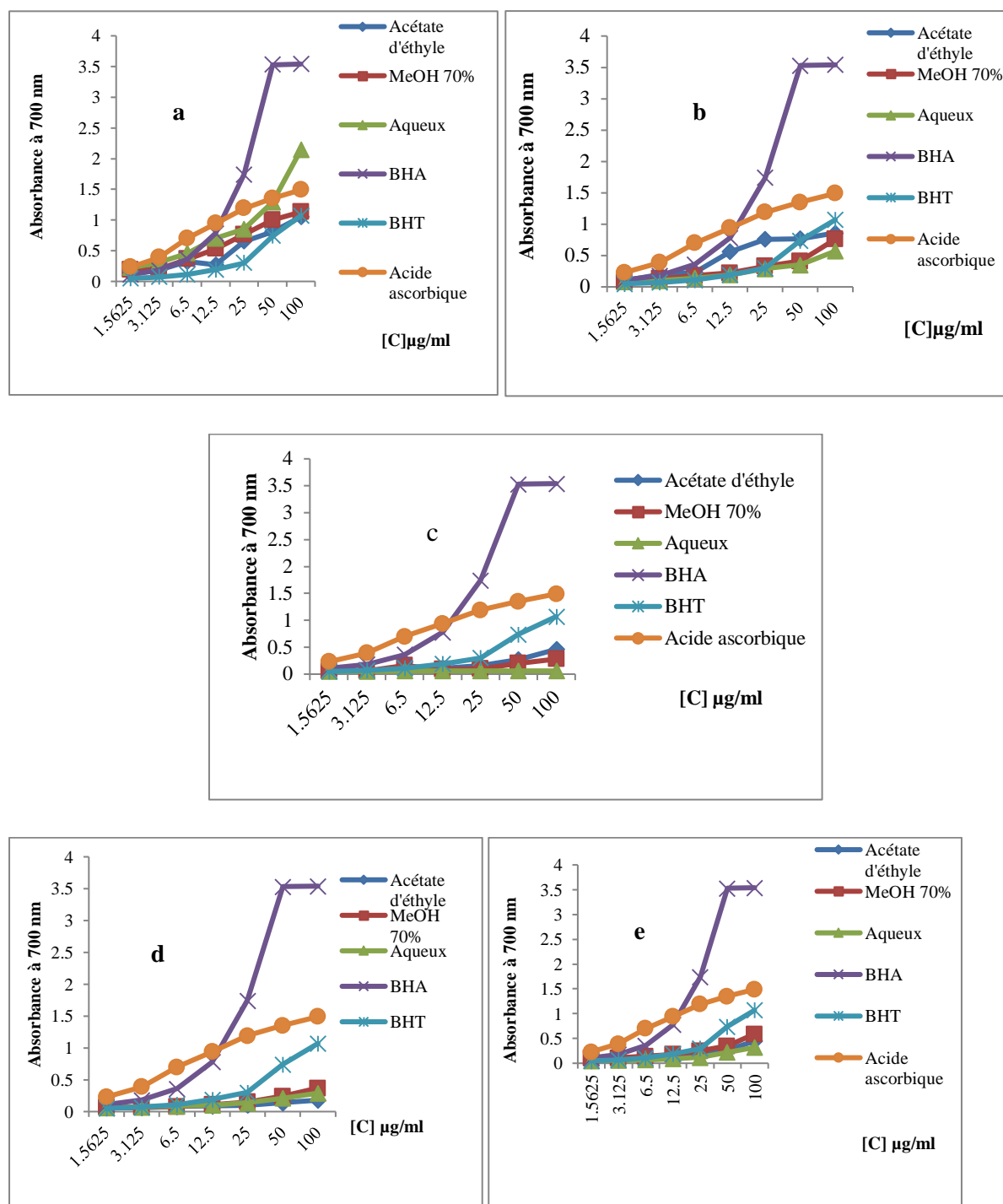
**Tableau 14:** Pouvoir réducteur du fer, exprimé en  $A_{0.50}$   $\mu\text{g/ml}$  des extraits secs des organes

d'*E. retusa*.

<b>Solvant</b> <b>Organes</b>	<b>Acétate d'éthyle</b>	<b>Méthanol 70%</b>	<b>Aqueux</b>
<b>Racines</b>	>100 <sup>h</sup>	80.90±3.75 <sup>f</sup>	>100 <sup>h</sup>
<b>Tiges</b>	>100 <sup>h</sup>	>100 <sup>h</sup>	>100 <sup>h</sup>
<b>Feuilles</b>	>100 <sup>h</sup>	>100 <sup>h</sup>	>100 <sup>h</sup>
<b>Capsules</b>	12.11±1.04 <sup>b</sup>	63.74±1.79 <sup>e</sup>	84.49±2.38 <sup>g</sup>
<b>Graines</b>	18.28±1.82 <sup>c</sup>	11.84±1.72 <sup>b</sup>	6.97±0.75 <sup>a</sup>
<b>BHA</b>	8.35±0.68 <sup>a</sup>	8.35±0.68 <sup>a</sup>	8.35±0.68 <sup>a</sup>
<b>BHT</b>	37.41±3.89 <sup>d</sup>	37.41±3.89 <sup>d</sup>	37.41±3.89 <sup>d</sup>
<b>Acide ascorbique</b>	<6.25 <sup>a</sup>	<6.25 <sup>a</sup>	<6.25 <sup>a</sup>

Les valeurs dans les cellules suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes à  $P<0.05$ .

BHT: butylated hydroxytoluene. BHA: butylatedhydroxyl anisole.



**Figure 22:** Profils des absorbances du pouvoir réducteur du fer des extraits secs des organes d'*E. retusa* et des standards utilisés. a : les grains; b : les capsules; c : les feuilles; d : les tiges ; e : les racines. BHA: butylatedhydroxyl anisole BHT : butylated hydroxytoluene.



### 2.2.5. L'activité antioxydante par la réduction du cuivre (CUPRAC)

Les résultats de l'absorbance de l'activité de la réduction cuprique (CUPRAC) en fonction de la concentration des extraits testés sont présentés dans la figure 24. En effet, les profils de l'absorbance des extraits de chaque organe en fonction de la nature du solvant révèlent que, l'extrait d'acétate d'éthyle montre une absorbance importante par rapport aux autres extraits.

- Pour les capsules à des concentrations  $\geq$  à 100  $\mu\text{g/ml}$ .
- Pour les feuilles à toutes les concentrations.
- Pour les racines à des concentrations supérieures à 100  $\mu\text{g/ml}$ .

Le profil de l'extrait aqueux des graines et des tiges présente des absorbance puissant à des concentrations inférieures à 400  $\mu\text{g/ml}$  par rapport aux autres extraits du même organe.

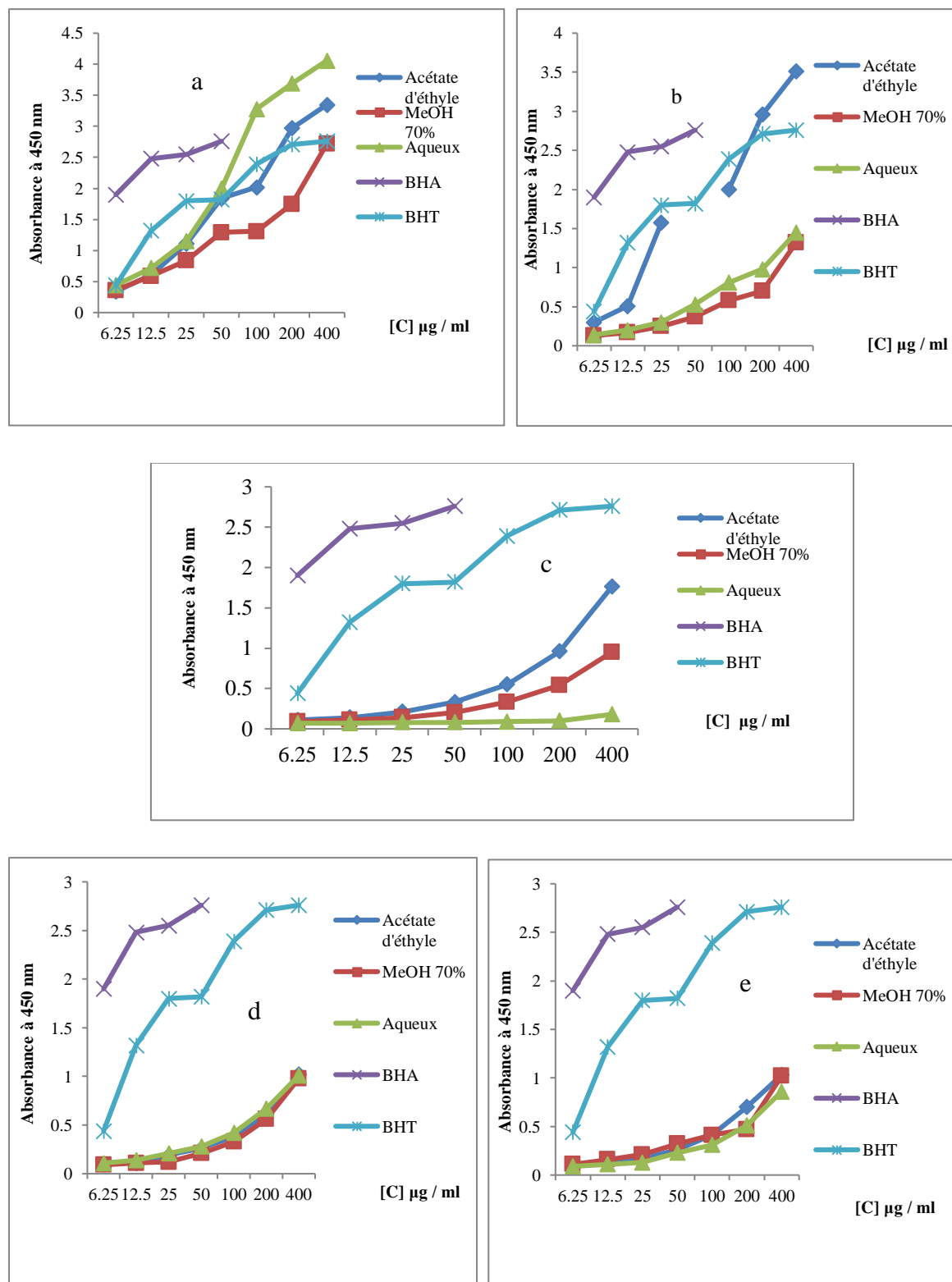
A une absorbance de 0.5, les extraits aqueux, méthanolique et d'acétate d'éthyle des graines montrent un pouvoir réducteur de cuivre plus important ( $A_{0.50} = 7.64 \pm 0.30$ ,  $9.93 \pm 0.38$  et  $10.64 \pm 0.99$   $\mu\text{g/ml}$ . respectivement) (classe A) que celui des autres extraits (tableau 15). Toutefois, l'extrait aqueux des feuilles a présenté une activité inhibitrice du CUPRAC la plus faible ( $A_{0.5} > 400$   $\mu\text{g/ml}$ ).

**Tableau 15:** Activité antioxydante de la réduction du CUPRAC exprimée en  $A_{0.50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ), des extraits secs des organes d'*E. retusa*.

Organes \ Solvant	Acétate d'éthyle	Méthanol 70%	Aqueux
<b>Racines</b>	131.78 $\pm$ 4.08 <sup>f</sup>	211.68 $\pm$ 3.18 <sup>k</sup>	194.45 $\pm$ 4.85 <sup>j</sup>
<b>Tiges</b>	153.53 $\pm$ 3.45 <sup>g</sup>	173.35 $\pm$ 1.21 <sup>h</sup>	134.28 $\pm$ 0.98 <sup>f</sup>
<b>Feuilles</b>	88.80 $\pm$ 3.18 <sup>e</sup>	180.34 $\pm$ 0.2 <sup>i</sup>	>400 <sup>l</sup>
<b>Capsules</b>	12.25 $\pm$ 0.54 <sup>b</sup>	81.75 $\pm$ 2.97 <sup>d</sup>	49.50 $\pm$ 1.51 <sup>c</sup>
<b>Graines</b>	9.93 $\pm$ 0.38 <sup>ab</sup>	10.64 $\pm$ 0.99 <sup>ab</sup>	7.64 $\pm$ 0.30 <sup>ab</sup>
<b>BHA</b>	6.62 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	6.62 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	6.62 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
<b>BHT</b>	6.64 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	6.64 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	6.64 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>

Les valeurs dans les cellules suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes à  $P < 0.05$ .

BHT: butylated hydroxytoluene. BHA: butylated hydroxyl anisole.



**Figure 23:** Profils de l'absorbance du CUPRAC des extraits secs des organes d'*E. retusa* et des standards utilisés. a : les graines; b : les capsules; c : les feuilles; d : les tiges; e : les racines. BHA: butylatedhydroxyl anisole BHT : butylated hydroxytoluene.

### 2.3. Evaluation de l'activité photoprotective par le facteur de protection solaire (FPS)

Les résultats du facteur de protection solaire illustrés dans le tableau 16 montrent une variabilité significative entre les différents extraits. Les valeurs du FPS des extraits aqueux et méthanolique des graines sont plus importantes ( $38.26 \pm 0.07$  et  $31.44 \pm 0.58$ , respectivement). Ces valeurs indiquent la haute protection de ces deux extraits. Les valeurs du FPS variant entre 15 et 30 des extraits sont des valeurs moyennement importantes. Par contre, les extraits aqueux et méthanolique des racines présentent des valeurs faibles.

**Tableau 16 :** Les valeurs moyennes du FPS des extraits secs d'*E. retusa*.

Organes \ Solvant	Acétate d'éthyle	Méthanol 70%	Aqueux
<b>Racines</b>	$23.90 \pm 0.38^d$	$13.55 \pm 0.96^h$	$12.07 \pm 0.08^i$
<b>Tiges</b>	$23.40 \pm 0.54^d$	$16.76 \pm 1.06^g$	$18.16 \pm 0.29^f$
<b>Feuilles</b>	$26.61 \pm 0.44^c$	$19.19 \pm 1.26^f$	$22.21 \pm 0.56^e$
<b>Capsules</b>	$26.50 \pm 0.13^c$	$16.62 \pm 1.07^g$	$15.57 \pm 0.24^g$
<b>Graines</b>	$24.54 \pm 0.15^d$	$31.44 \pm 0.58^b$	$38.26 \pm 0.07^a$

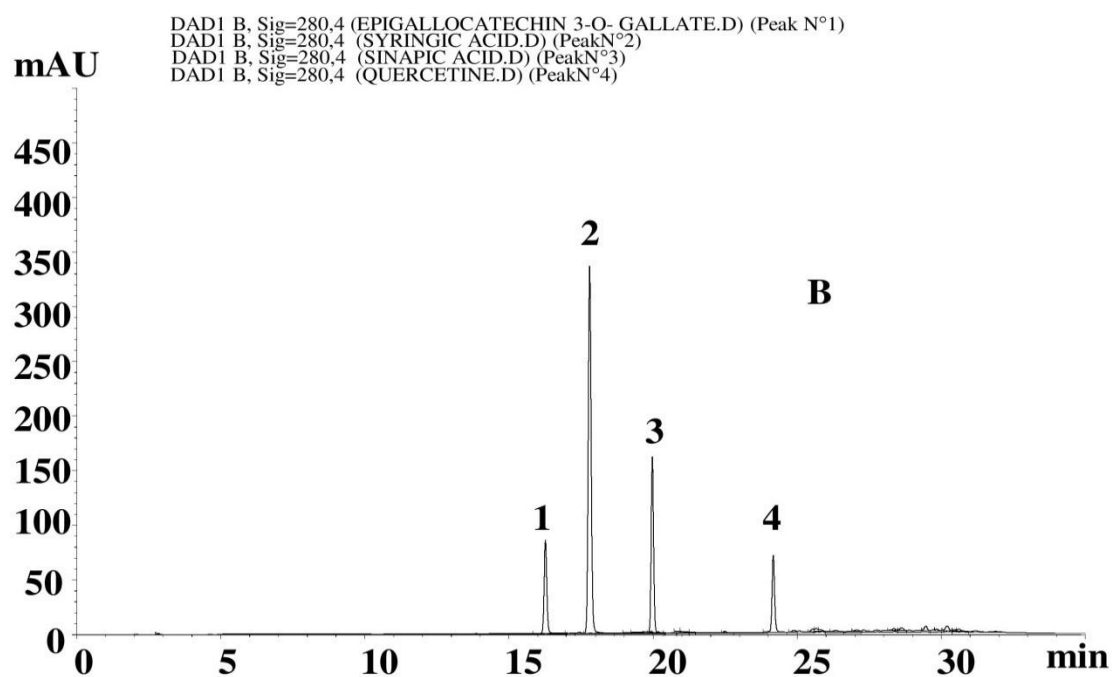
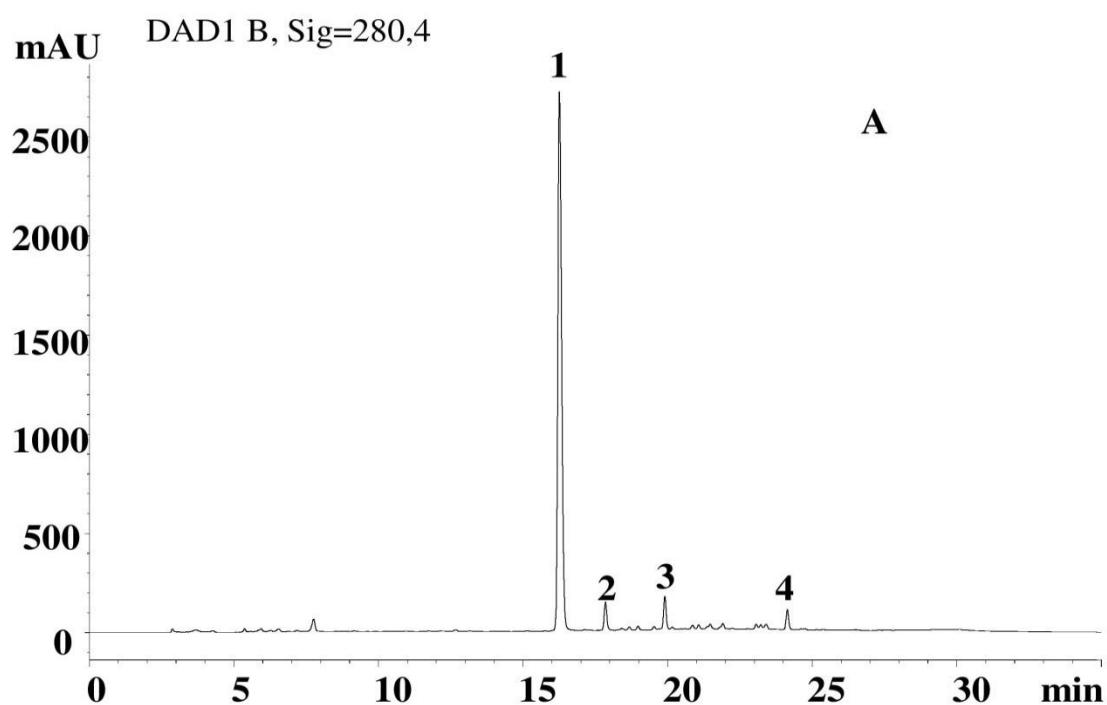
Les valeurs dans les cellules suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes à  $P < 0.05$ .

### 2.4. Caractérisation phytochimique par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

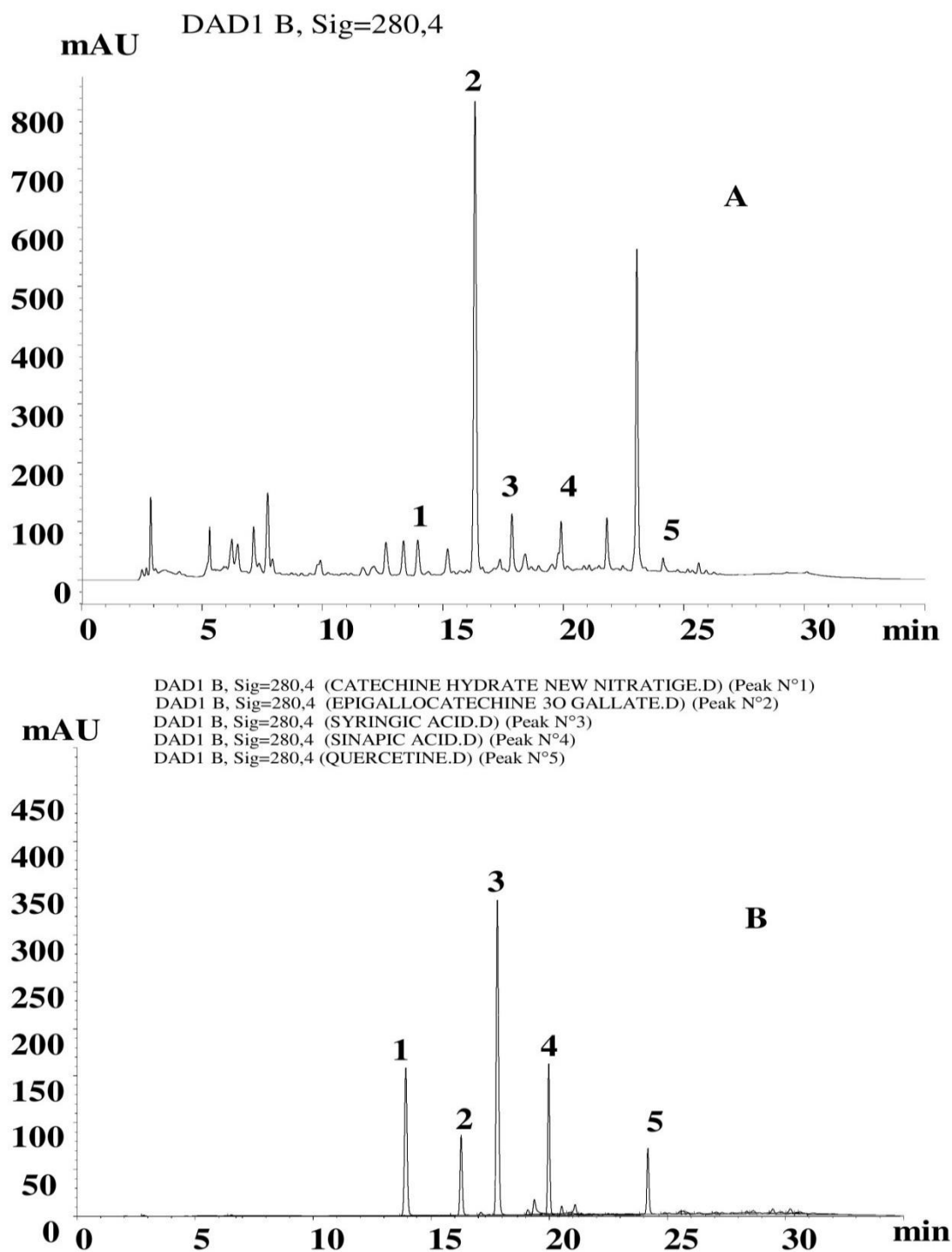
Les analyses chromatographiques ont été effectuées sur les extraits méthanoliques des tiges, feuilles, capsules et graines d'*E. retusa*. En se basant sur la détermination des pics majoritaires, juste les pics des extraits méthanoliques des graines et des capsules d'*E. retusa* sont identifiés (figure 25 A et B, figure 28 A et B).

Le profil chromatographique de l'extrait méthanolique des graines d'*E. retusa* (figure 25 A et B) révèle la présence de quatre pics majeurs avec des temps de rétention variant entre 16 et 25 min. La comparaison des temps de rétention et des caractéristiques spectrales avec les standards de référence a permis d'identifier deux acides phénoliques (acide syringique et acide sinapique) et deux flavonoïdes (epigallocatechin 3-O- Gallate et quercetine). Le flavonoïde Epigallocatechin 3-O- Gallate est un composé majoritaire avec un temps de rétention de 16.267 min (Annexe 3).

Le profil chromatographique de l'extrait méthanolique des capsules d'*E.retusa* est formé par cinq pics. La comparaison des temps de rétention et des caractéristiques spectrales avec les standards de référence a permis d'identifier deux acides phénoliques (acide syringique et acide sinapique) et trois flavonoïdes (hydrate catechine, epicatechin3-Ogallate, et quercetine). Le temps de rétention de ces composantes variant entre 13.5 et 24.5 min dont un pic majoritaire avec un temps de rétention de 16.267 min correspondant au flavonoïde Epicatechin3-Ogallate (figure 26 A et B).



**Figure 24:** Profil chromatographique enregistré à 280 nm des principaux composés phénoliques d'extrait méthanolique des graines d'*E. retusa* (A), mélange de standards (B). Les numéros des pics correspondent à: 1- Epigallocatechin 3-O- Gallate, 2- Acide syringique, 3- Acide sinapique, 4-Quercetine.



**Figure 25:** Profil chromatographique enregistré à 280 nm des principaux composés phénoliques d'extrait méthanolique des capsules d'*E. retusa* (A), mélange de standards (B). Les numéros des pics correspondent à: 1- Catéchine hydraté, 2- Epigallocatechin 3-O- Gallate, 3- Acide syringique, 4- Acid sinapique, 5-Quercétine.

## Chapitre IV. Discussion

### 1. Variations des teneurs en composés phénoliques et des activités antioxydantes d'*E. granulata*

Les résultats obtenus sur cette espèce ont montré une variabilité importante de la teneur en polyphénols, flavonoïdes totaux et des différentes potentialités antioxydantes testés en fonction de la nature du solvant.

#### 1.1. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques chez les plantes présentent une variabilité interspécifique, intra spécifique et même entre les organes d'une même espèce (Abu Arra et *al.*, 2011 ; Falleh et *al.*, 2012b ; Coulibaly et *al.*, 2014 ; Khiralla et *al.*, 2015).

Concernant la variabilité des teneurs en composés phénoliques de la partie aérienne d'*E.granulata*, l'extrait méthanolique a donné les meilleures teneurs en polyphénols aussi bien que pour les flavonoïdes totaux.

Dans ce contexte, l'étude réalisée par Altun et al. (2013) a montrée que le méthanol est le meilleur solvant pour extraire les polyphénols d' *Hypericum perforatum* en comparaison avec l'acétate d'éthyle et l'eau distillée par l'extraction en macération. En outre, l'étude réalisée par Ashraf et al. (2015) a présentée que, l'extrait méthanolique de la partie aérienne d'*Euphorbia royleana* est plus riche en polyphénols que l'extrait aqueux obtenu par l'agitation. Par ailleurs, la nature du solvant détermine le type de molécules extraites (Green, 2004; Barchan et *al.*, 2014). Pour cela certaines études utilisent un mélange entre différents solvants avec des rapports variables pour une meilleur extraction des composés phénoliques (Trabelsi et *al.*, 2010; Falleh et *al.*, 2011). En outre, non résultats des deux extraits méthanolique et aqueux sont importants que l'extrait de la partie aérienne d'*Euphorbia royleana* ( $56.97 \pm 0.27$  µg EAG/ mg d'extrait pour l'extrait méthanolique et  $30.65 \pm 0.46$  µg EAG/ mg d'extrait pour l'extrait aqueux) (Ashraf et *al.*, 2015). Par ailleurs, les flavonoïdes jouent un rôle très important dans la santé humaine notamment pour les maladies cardiovasculaires (Filippi et *al.*, 2017; Saeed et *al.*, 2012). Pour cela, l'évaluation de ces composés est nécessaire. En effet, la teneur en flavonoïdes d'extrait aqueux de la partie

aérienne de *Zizyphus lotus* L. (2.66 mg EQ/mg d'extrait) rapporté par Khouchlaa et al. (2017) est largement inférieur à non résultats pour l'extrait aqueux et méthanolique de la partie aérienne d'*E.granulata*. Par contre, les résultats de la teneur en flavonoïde sont négatifs pour l'extrait d'acétate d'éthyle de la partie aérienne d'*E.granulata*, ce que signifie que cet extrait est pauvre en flavonoïdes moins polaires et de polarité similaire au solvant d'acétate d'éthyle d'une part et d'autres part à la richesse d'*E.granulata* en flavonoïdes plus polaires et ceux glycosylés (Pessel, 2013). Ces résultats confirment que la polarité du solvant est choisie en fonction du type de composé recherché.

## 1.2. Le potentiel antioxydant des composés phénoliques

Les tests utilisés pour évaluer les activités antioxydantes *in vitro* de la partie aérienne d'*E.granulata* ont consisté à déterminer: l'activité antiradicalaire du test DPPH, piégeage du radical-cation ABTS<sup>+</sup>, le pouvoir réducteur, l'activité antioxydante par la réduction du cuivre (CUPRAC) et l'activité de métal chélate. En effet, l'activité antiradicalaire d'extrait méthanolique est le plus puissant pour stabiliser le radical DPPH que les autres extraits. A 100 µg/ml, la capacité antioxydante des deux extraits méthanolique et aqueux est largement supérieure au pourcentage d'inhibition des extraits méthanoliques et aqueux de la partie aérienne d'*Euphorbia royleana* (extrait méthanolique: PI= 28.22 ± 1.46 % et extrait aqueux: PI= 20.18 ± 0.96, respectivement) (Ashraf et al., 2015). Identiquement à l'activité antiradicalaire, l'extrait méthanolique est l'extrait le plus puissant pour piéger du radical-cation ABTS<sup>+</sup>. Ainsi, et en comparaison avec d'autres résultats, la capacité de neutraliser le radical ABTS<sup>•</sup> de l'extrait aqueux d'*E.granulata* est plus élevé que les extraits aqueux des plantes comestibles testées par Zengin Kurt et al. (2018) à savoir (*Arum maculatum*, *Ornithogalum sigmoideum*, *Rumex acetosella*, *Capsella bursa-pastoris*, *Hypericum orientale*, *Achillea millefolium*, *Silene vulgaris*, *Coronopus squamatus*, *Plantago lanceolata* et *Rumex crispus*). Concernant l'activité chélatrice, l'extrait aqueux présente un effet chélateur plus élevé que les deux autres extraits. À 100 mg/ml, le pourcentage d'inhibition de cet extrait est supérieur à 50%. De plus, la valeur de CI<sub>50</sub> de l'activité de métal chélate de l'extrait méthanolique de la partie aérienne d'*E.granulata* est importante que celle de l'extrait méthanolique de *Gyromitra esculenta* (CI<sub>50</sub>: 262.9 ± 1.18 mg/ml) indiqué par Tel et al. (2015). En outre la capacité de l'extrait d'acétate d'éthyle de la partie aérienne d'*E.granulata* à la chélation des ions ferreux est plus élevée que ceux des résultats trouvés par Tel et al. (2015) pour l'extrait d'acétate d'éthyle de l'espèce *Lyophyllum decastes* (CI<sub>50</sub>: 408.1 ± 1.36



mg/ml) et par Bensouici et al. (2015) pour l'extrait d'acétate d'éthyle de la partie aérienne de l'espèce *Sedum caeruleum* (CI<sub>50</sub>: 161.43 ± 2.34 mg/ml). Par ailleurs, l'extrait méthanolique présente une activité importante pour réduire le fer. Par contre, l'extrait aqueux est le meilleur extrait pour réduire le cuivre. De plus, non résultats d'absorbance de l'activité du CUPRAC des extrais méthanoliques et aqueux de la partie aérienne d'*E.granulata* sont moins importants que ceux trouvés par Sharma et Pal Vig (2013) pour l'extrait méthanolique et aqueux de *Parkinsonia aculeata* à 200 µg/ml (DO < 0.5).

Cependant, on a constaté qu'il ya une corrélation positivement entre les polyphénols, les flavonoïdes totaux, la capacité de stabiliser le radical de DPPH, de neutraliser le radical ABTS et la capacité de réduire le fer d'extrait méthanolique de la partie aérienne d'*E.granulata*. Par contre, l'extrait aqueux présente une capacité importante de la capacité de réduire le cuivre et de chélater les ions ferreux. Ce qui signifie que chaque activité antioxydante ne dépend pas seulement de la teneur en polyphénols mais aussi de la structure et de l'interaction entre certains composés (Oueslati, 2013). Alors que, l'extrait d'acétate d'éthyle est arrangé en dernière classe pour tous les tests.

### 1.3. Caractérisation phytochimique par Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

Les chromatogrammes des composés phénoliques de l'extrait méthanolique de la partie aérienne d'*E.granulata* nous a permis d'identifier quatre acides phénoliques (acide gallique, acide caféique, acide p-coumarique et acide rosmarinique) et quatre flavonoïdes (résorcinol, rutine, isorhamnetin-3-O-glucoside et kaempférol-3-O-rutinoside). Par ailleurs, les quatre acides phénoliques identifiés sont connus par des activités antioxydantes (Yuki Sato et al., 2011; Fernandes et Salgado, 2015; Pei et al., 2015; Hossan et al., 2014). Ainsi, le résorcinol est largement utilisé dans la fabrication de plusieurs médicaments et produits pharmaceutiques principalement utilisés pour les affections topiques, les crèmes contre l'acné, les teintures capillaires et les shampooings antipelliculaires (Trivedi et al., 2015).

En outre, la rutine ne fait plus partie des médicaments officiels, elle est caractérisée par une activité anti-Alzheimer et par un effet analgésique et anti-nociceptif (Ganeshpurkar et Saluja, 2017). Le flavonoïde isorhamnetin-3-O-glucoside, se caractérise par des propriétés antioxydantes notamment la protection des membranes cellulaires contre la peroxydation des lipides (Zielińska et al., 2001). Le kaempférol-3-O-rutinoside (K-3-G) est connu par des effets protecteurs contre les lésions hépatiques oxydatives aiguës induites par le CC14 (Wang et al.,

2015). De plus, l'acide caféique est un composé majoritaire. Cet acide présente des propriétés antibactériennes (Perumal et al., 2015), anti cancérogènes et il contrôle le niveau du cholestérol y compris le triglycéride (Ye et al., 2010). Aussi, l'acide caféique est l'un des composés majoritaire dans certaines plantes médicinales comme *Euphorbia hirta* (Perumal et al., 2015) et *Ocimum gratissimum* linn (Ye et al., 2010).

En comparaison avec d'autres travaux d'identification des composés phénoliques par le CLHP dans le genre *Euphorbia.*, luteolin-7-O-glucoside est le flavonoïde glycoside majeur dans l'extrait méthanolique de la partie aérienne d'*E. hirta* (Pióro-Jabrucka et al., 2011) et 9,12,15-octadecatrien-1-ol était le composé dominant dans l'extrait éthanolique de la partie aérienne d'*E. hirta* L.(Sharma et al., 2014).

## **2. Variations des teneurs en composés phénoliques, des activités antioxydantes et photoprotectives d'*Euphorbia retusa*.**

### **2.1. Teneurs en composés phénoliques**

Les résultats de la variabilité de la teneur en polyphénols totaux varient considérablement en fonction de la nature du solvant utilisé dans l'extraction et le type d'organe étudié.

Concernant l'effet du solvant sur les organes, la teneur en polyphénols est variable entre presque tous les organes. En effet, le meilleur solvant pour extraire les polyphénols chez les capsules c'est l'acétate d'éthyle, le méthanol est le meilleur solvant pour extraire les polyphénols des tiges et des feuilles et l'eau distillée c'est le meilleur solvant pour extraire les polyphénols des graines et des racines, cette variabilité est due à la variabilité de la polarité des composés phénoliques entre les organes est par conséquent la variation de la solubilité de ces composés dans les solvants (Baldosano et al., 2015; Trabelsi et al.,2010).

Par ailleurs, la teneur en polyphénols est hétérogène entre les organes d'*E. retusa*. Cette variabilité des polyphénols dans les différents organes d'une même plante a été reportée par plusieurs auteurs (Öztürk et al., 2007; Falleh et al., 2008; Ksouri et al., 2008; Benhammou, 2011; Beddou, 2015; Karoune et al., 2015). En outre, les graines et les capsules d'*E. retusa* sont plus riches en polyphénols que les tiges, les feuilles et les racines. Falleh et al. (2008) ont montré que les graines et les feuilles de *Cynara cardunculus* sont plus riches en

polyphénols que les fleurs. Ksouri et al. (2009) a trouvé aussi que les extraits des fleurs sont beaucoup plus riches en polyphénols totaux que ceux des feuilles chez *Tamarix gallica* L.

Dans un autre contexte, et indépendamment de la variabilité du solvant et de l'organe, on souligne que les teneurs en composés phénoliques des extraits d'*E. retusa* sont bien plus élevées que celles trouvées par Ghareeb et al. (2018) pour l'extrait méthanolique de la partie aérienne de la même espèce provenant de l'Égypte ( $33.9 \pm 0.65 \mu\text{g EAG/ mg d'extract}$ ). Par contre, la teneur en composés phénoliques de l'extrait méthanolique des feuilles est moins importante que les résultats trouvés par (Asha et al., 2016) pour l'extrait méthanolique des feuilles d'*Euphorbia hirta* ( $285.41 \pm 3.00 \mu\text{g EAG/ mg d'extract}$ ).

La teneur en polyphénols totaux des graines d'*E. retusa* est supérieure que celle d'extrait méthanolique des graines de *Cassia auriculata* (Linn.) avec ( $86.93 \pm 2.45 \mu\text{g EAG/ mg d'extract}$ ) (Joshi et al., 2015).

Les teneurs en polyphénols totaux des extraits méthanoliques et aqueux de la partie aérienne d'*E. granulata* sont proches de ceux trouvés pour les trois extraits de graines et l'extrait d'acétate d'éthyle des capsules d'*E. retusa*.

D'après les résultats obtenus et identiquement à la teneur en polyphénols totaux, la teneur en flavonoïdes totaux a montré une variabilité entre les quinze extraits d'*E. retusa*. Ainsi, les deux extraits d'acétate d'éthyle et aqueux des graines et l'extrait d'acétate d'éthyle des capsules présentent des teneurs plus élevées. De plus, les teneurs de ces quatre extraits sont nettement supérieures à la teneur en flavonoïdes totaux d'extrait méthanolique des graines de *Cassia auriculata* (Linn.) ( $53.787 \pm 0.757 \mu\text{g EQ/ mg d'extract}$ ) trouvées par Joshi et al. (2015). Toutefois, la pauvreté d'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles et d'extrait méthanolique des racines en flavonoïdes totaux est probablement due au manque de ces organes en flavonoïdes qui ont une polarité convenable au solvant d'extraction. En outre, l'extrait méthanolique des tiges d'*E. retusa* a une valeur moyennement élevée que celle d'extrait méthanolique des tiges de *Rheum ribes* trouvées par Öztürk et al. (2007) ( $13.66 \pm 0.75 \mu\text{g EQ/ mg d'extract}$ ). Ainsi, les résultats de la teneur en flavonoïdes d'extrait méthanolique des feuilles sont inférieurs aux résultats trouvés par Asha et al. (2016) pour l'extrait méthanolique des feuilles d'*Euphorbia hirta* ( $32.29 \pm 6.0 \mu\text{g EQ/ mg d'extract}$ ).

La teneur en flavonoïdes totaux chez les deux extraits méthanolique et aqueux d'*E. granulata* présente une importance assez faible par rapport aux trois extraits des graines d'*E. retusa*. Par contre l'extrait d'acétate d'éthyle de la partie aérienne d'*E. granulata* et des

feuilles d'*E. retusa* sont pauvre en flavonoïdes moins polaires et aussi l'extrait méthanolique des racines.

## 2.2. Le potentiel antioxydant des composés phénoliques

Nous avons utilisés les mêmes activités antioxydantes testées sur les extraits d'*E. granulata* sauf l'activité de métal chélate est remplacé par le test d'inhibition du blanchiment de la  $\beta$ -carotène.

Pour le test DPPH, le degré de changement de la couleur est proportionnel avec la concentration et le potentiel des antioxydants (Saeed et al., 2012). En effet, l'extrait aqueux des racines présente une activité importante suivi par les extraits des graines et des capsules. En outre, le pourcentage d'inhibition d'acétate d'éthyle des graines d'*E. retusa* à 200  $\mu\text{g/ml}$  est inférieur au pourcentage d'inhibition des feuilles d'extrait d'acétate d'éthyle d'*Anthocephalus cadamba* (90.03 %) à 400  $\mu\text{g/ml}$  (Chandel et al., 2012). Ainsi, à 100  $\mu\text{g/ml}$  le pourcentage d'inhibition d'extrait d'acétate d'éthyle et d'extrait aqueux des racines

d'*E. retusa* sont supérieurs aux pourcentage d'inhibition d'extrait d'acétate d'éthyle et d'extrait aqueux des racines de *Saururus chinensis* ( $43.01 \pm 0.32$  % et  $21.21 \pm 0.11$  %, respectivement) (Alaklabi et al., 2017).

En outre, les valeurs de la  $CI_{50}$  sont généralement variables dont, l'extrait aqueux des racines, l'extrait méthanolique des graines et l'extrait d'acétate d'éthyle des capsules et des graines sont plus actifs que le témoin BHT où la capacité de stabiliser le radical DPPH par les graines est trois fois supérieure à celle de BHT. L'activité antioxydante de ces quatre extraits est globalement plus efficace que l'extrait méthanolique des graines de *Cynara cardunculus* L. ( $CI_{50} = 23$   $\mu\text{g/ml}$ ) rapporté par Falleh et al. (2008) et de *Cassia auriculata* (Linn.) ( $CI_{50} = 77.489 \pm 2.072$   $\mu\text{g/ml}$ ) cité par Joshi et al. (2015). Par contre, la valeur de  $CI_{50}$  d'extrait méthanolique des racines est inférieure à la valeur de  $CI_{50}$  d'extrait méthanolique des racines de *Saururus chinensis* ( $15.13 \pm 0.23$   $\mu\text{g/ml}$ ) rapporté par Alaklabi et al. (2017). Ces résultats montrent que les graines contiennent des composés phytochimiques beaucoup plus capables de donner l'hydrogène au radical pour inhiber les dommages oxydatifs.

En outre, l'extrait d'acétate d'éthyle des graines et des capsules, l'extrait méthanolique des graines et l'extrait aqueux des racines d'*E. retusa* présentent une activité antiradicalaire importante que les autres extraits d'*E. retusa* et les extraits d'*E. granulata*.

Concernant l'activité du piégeage du radical-cation ABTS<sup>•+</sup>, les trois extraits des graines sont plus actifs que les autres extraits. Ces extraits et l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait aqueux des capsules sont plus importants que l'extrait méthanolique de la partie aérienne de *Micromeria cilicica* ( $CI_{50} = 37.1 \pm 0.10 \mu\text{g/ml}$ ) (Öztürk et al., 2011). Ainsi, à 100  $\mu\text{g/ml}$  les pourcentages d'inhibition d'extrait d'acétate d'éthyle et d'extrait aqueux de la racine d'*E. retusa* sont plus élevés que ceux de l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait aqueux de la racine de *Saururus chinensis* rapporté par Alaklabi et al. (2017) ( $40.31 \pm 0.41 \%$  et  $19.07 \pm 0.12 \%$ , respectivement).

Pour cette capacité et en comparaison avec les résultats des trois extraits des graines et l'extrait aqueux des capsules d'*E. retusa* ont une valeur de  $CI_{50}$  plus élevée que les extraits d'*E. granulata*.

Par ailleurs, l'évaluation de l'activité antioxydante par le blanchiment de la  $\beta$ -carotène est une méthode utilisée pour mesurer la capacité d'un extrait d'inhiber l'oxydation des lipides (Moualek et al., 2016). En effet, l'extrait aqueux des racines, des graines et des capsules présentent les pourcentages d'inhibitions les plus importantes. Ainsi, les pourcentages d'inhibition de l'extrait d'acétate d'éthyle des graines et des capsules

d'*E. retusa* sont plus élevés pour toutes les concentrations que l'extrait d'acétate d'éthyle des racines de *Rhodomyrtus tomentosa* ( $60.53\%$  à  $1000 \text{ mg/ml}$ ) (Abd Hamid et al., 2017).

L'analyse des résultats de cette activité exprimés en  $CI_{50}$  affiche une hétérogénéité importante entre les extraits testés. En effet, les trois extraits des graines, les deux extraits d'acétate d'éthyle et aqueux des capsules et l'extrait aqueux des racines inhibent l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du  $\beta$ -carotène plus que les autres extraits.

Dans le pouvoir réducteur, le changement de la couleur jaune au couleur vert est proportionnel à la capacité réductrice d'extrait (Saeed et al., 2012). En effet, la capacité de réduction du fer est très différente entre les extraits d'*E. retusa* testés et elle est plus importante chez les trois extraits des graines et l'extrait d'acétate d'éthyle des capsules que les autres extraits et que celle de BHT. Ces valeurs sont plus intéressantes que celle trouvée dans les extraits d'acétate d'éthyle, méthanoliques et aqueux des racines de *Saururus chinensis* ( $1.71$ ,  $0.77$  et  $1.43$ , respectivement) rapporté par (Alaklabi et al., 2017) à  $100 \mu\text{g/ml}$ .

En outre, les deux extraits méthanolique et aqueux des graines et l'extrait d'acétate d'éthyle des capsules possèdent une forte capacité réductrice du fer que les autres extraits d'*E. retusa* et les extraits de la partie aérienne *E. granulata*. Par contre, la valeur de  $A_{0.50}$  de l'extrait d'acétate d'éthyle des graines est presque similaire à celle de l'extrait méthanolique d'*E. granulata*.

L'activité antioxydante de la réduction du CUPRAC est une méthode se base sur la conversion des hydroxyles phénoliques en quinones à travers la réduction du complexe  $Cu^{2+}$ -Nc, produisant ainsi un complexe hromogène de  $Cu^{+}$ -Nc qui absorbe à 450 nm (Ben Rhouma-Martin, 2013). La comparaison des résultats d'absorbance des extraits de chaque organe en fonction des trois solvants met en évidence que l'extrait d'acétate d'éthyle a donné des absorbances remarquable pour les graines, les capsules, les feuilles et les racines. Par contre, les tiges se caractérisent par des absorbances élevés pour l'extrait aqueux. En outre, la valeur de  $A_{0.50}$  la plus importante est enregistrée chez les trois extraits de graines que celle des autres extraits et de l'extrait méthanolique de la partie aérienne de *Ganoderma lucidum* ( $A_{0.5} = 20.7 \pm 1.21 \mu\text{g/ml}$ ) (Tel et al., 2012).

Dans ce cas, les trois extraits de graines et l'extrait d'acétate d'éthyle des capsules, d'*E. retusa* présentent une capacité antioxydante élevée que les autres extraits d'*E. retusa* et les extraits de la partie aérienne d'*E. granulata*.

### 2.3. Evaluation de l'activité photoprotective par le facteur de protection solaire (FPS)

Le facteur de protection solaire (FSP) est une mesure quantitative reflète principalement la protection contre les UVB (Mbanga et al., 2014 ; Ho, 2001).

Le FSP est généralement divisé en quatre catégories : une faible protection (la valeur du FSP entre 2 et 15), une moyenne protection (la valeur du FSP entre 15 et 30), haute protection (la valeur du FSP entre 30 et 50) et très haute protection (la valeur du FSP est plus de 50) (Schalka et Reis, 2011).

*In vivo*, la mesure du FPS (Facteur de Protection Solaire) se base sur la réponse érythémale due aux rayonnements UVB. En effet, les extraits d'*E. retusa* testés sont classés en trois catégorie de protection solaire; les deux extraits aqueux et méthanolique des graines présentent une forte protection solaire, les extraits d'acétate d'éthyle des cinq organes, les extraits méthanoliques et les extraits aqueux des tiges des feuilles et des capsules se

caractérisent par une protection moyenne. Par contre, les deux extraits aqueux et méthanolique des racines incluent dans la catégorie de protection faible. En comparaison avec d'autres résultats, la valeur de l'FPS des extraits d'*E.retusa* sont plus importantes que l'extrait aqueux des feuilles de *Desmodium gangeticum* rapporté par Das et al. (2017) (FPS = 7.276). Ainsi, les valeurs de FPS d'extrait méthanolique des graines est plus importante aussi que la valeur trouvée par Napagoda et al. (2016) (FPS =  $29.5 \pm 0.30$ ) pour l'extrait aqueux des graines de *Mollugo cerviana* et pour l'extrait méthanolique de la partie aérienne de *Capnophyllum peregrinum* (L.) rapporté par Lefahal et al. (2018) avec (SPF=  $35.21 \pm 0.18$ ).

Généralement les organes riches en polyphénols et en flavonoïdes totaux donnés des activités antioxydantes importantes cette corrélation positive est rapportée par plusieurs auteurs (Oueslati et al., 2012; Trabelsi et al., 2012). Toutefois, l'extrait aqueux des racines a donné une activité antiradicalaire et activité inhibitrice du blanchiment de la  $\beta$ -carotène plus importante malgré la valeur faible en polyphénols totaux de ces deux extraits par rapport à la majorité des autres extraits testés. Ce qui signifie que, les racines ont des composés phytochimiques capables de donner l'hydrogène au radical DPPH et de stabiliser la capacité d'inhiber l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du  $\beta$ -carotène. Donc, à la lumière de ces résultats chaque activité antioxydante n'est pas seulement liée à la teneur des polyphénols mais aussi à la structure et à l'interaction de certaines molécules.

Dans un autre contexte, certains auteurs ont montré que la corrélation entre les teneurs en flavonoïdes et le facteur de protection solaire est positif (Souza et al., 2015; Raimundo et al., 2013). D'après nos résultats, les extraits riches en flavonoïdes ont un pouvoir protectif plus élevé à moyennement élevé. Toutefois, l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles pauvre en flavonoïdes présente une activité protectrice moyenne ce qui reflète que l'activité protectrice est liée à des composantes phénoliques spécifique. De même, les valeurs du FPS des extraits aqueux des feuilles et des capsules sont faibles que celles des extraits d'acétate d'éthyle des feuilles, des tiges et des racines malgré que ces derniers extraits présentent des faibles valeurs en flavonoïdes, ce qui signifie une autre fois, que cette activité est due probablement non seulement à la teneur des flavonoïdes mais aussi à la structure de certains flavonoïdes et/ou à d'autres composés phénoliques. Aussi, Napagoda et al. (2016) a montrés que, la présence de métabolites secondaires ayant une propriété antioxydante pourrait être responsable de la forte absorbance des UV.

## 2.4. Caractérisation phytochimique par Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

Les résultats d'analyse chromatographique des extraits méthanoliques des graines et des capsules ont montrés que les pics des composés phénoliques identifiés sont presque identiques entre les deux extrait dont, deux acides phénolique sont identifiés (acide syringique et acide sinapique) avec deux flavonoïdes (epigallocatechin 3-O- gallate et quercetine). Le flavonoïde epigallocatechin 3-O- gallate est considéré comme un composé majeur chez les deux extraits. Toutefois, les capsules se distinct des graines par un autre composé qu'il est le catéchine hydraté. Ce qui signifié que, ce dernier flavonoïde présente dans le péricarpe. Les cinq composés phénoliques identifiés sont connus par leurs pouvoir antioxydants (Marinova and Yan-ishlieva, 2003; Zhang et al., 2012 ; Mehra et al., 2013; Shin et al., 2013; Hameed et al., 2016). En outre, la quercetine est corrélé positivement avec les activités antioxydantes notamment la  $\beta$  carotène (Falleh et al., 2012b). Par ailleurs, epigallocatechin 3-O- gallate est le composé majeur dans les graines et les capsules, c'est un flavonoïde connus par leurs activités biologiques tel que l'activité anti-inflammatoire, antinéoplasique, antibactérienne et il peut joue un rôle importants dans la préservation des plaquettes (Filippi et al., 2017; Matsumura et al., 2009; Lee et al., 2014; Lin et al., 2017 ; Perumal et al., 2015) . En comparaison avec d'autres résultats trouvés dans la même espèce, Sdayria et al. (2019) a été trouvé que l'acide gallique est l'acide phénolique majeur dans l'extrait méthanolique des feuille d'*E. retusa* pousse en Tunisie.

Les résultats de la composition phénolique et des activités antioxydantes obtenus montre une variabilité entre les deux espèces étudiés, cette variabilité est moyennement comparable puisque les organes d'*E. retusa* sont séparés l'un des autres. Alors que, la partie aérienne de l'espèce *E. granulata* (tiges, feuilles, capsules) a été utilisé entièrement sans la séparation des organes. Ainsi, la période d'analyse est généralement différente entre les extrais des deux espèces. D'ailleurs, la variabilité de la composition phénolique et les activités antioxydantes entre les espèces du même genre est significativement notable par Falleh et al. (2009) au sein du genre *Mesembryanthemum*. (*M. edule*, *M. crystallinum* et *M. nodiflorum*), Bensouici (2015) entre *Sedum caeruleum* et *Sedum pubescens*, Zengin et al. (2018) pour les trois espèces du *Salvia* (*S. blepharochlaena*, *S. euphratica* var. *leiocalycina*, and *S. verticillata* subsp. *Amasiaca*), Kaplaner et al. (2017) entre *Tricholoma imbricatum* et *Tricholoma focale*, Oueslati et al. (2013) entre quatre halophytes du genre *Suaeda* (*S.*



*fruticosa*, *S. pruinosa*, *S. mollis* et *S. maritima*) et Chikhi et al. (2013) entre *Phagnalon saxatile* et *Phagnalon sordidum*.

Cependant, des facteurs endogènes tels que les facteurs génétiques conduisant à des différences importantes entre les espèces du même genre (Oueslati et al., 2012). De plus, des facteurs exogènes abiotiques et biotiques peuvent aussi influencer sur la composition phénoliques et les activités antioxydantes au niveau de la diversité intra spécifique. Dans ce contexte, la teneur des composés phénoliques y compris les flavonoïdes particulièrement et l'activité des enzymes antioxydants sont augmentées avec l'augmentation de l'intensité lumineuse (Macheix et al., 2005; Albayrak et Aksoy, 2019). En outre, de nombreuses études ont montré que les polyphénols jouent un rôle important dans le mécanisme de défense anti-oxydant sous stress salin par la surproduction de ces composés (Falleh et al., 2012 a; Ksouri et al., 2008).

**En conclusion**, les résultats obtenus dans ce chapitre mettent en évidence la diversité entre les extraits d'*E. granulata* et entre les organes d'*E. retusa*. Cette variabilité est bien marquée au niveau des composés phénoliques, des pouvoirs antioxydant et de l'activité photoprotective. En effet, et d'une manière générale l'extrait méthanolique de la partie aérienne d'*E. granulata* est plus riche en composés phénoliques et plus actif que les autres extraits de la même plante. Aussi, les graines et les capsules d'*E. retusa* se sont distinguées d'autres organes par leur richesse en composés phénoliques ainsi que par leurs propriétés biologiques importantes. Ces données permettent de retenir ces deux espèces pour d'autres investigations plus approfondies afin de confirmer leurs potentialités biologiques.

### Conclusion générale et perspectives

Dans le but de valoriser la vertu thérapeutique des espèces de plantes du genre *Euphorbia*, le présent travail porte sur l'investigation phytochimique de deux espèces sahariennes : *E. granulata* Forssk et *E. retusa* Forssk recueillies de la plaine d'El-Outaya située au Nord de la Wilaya de Biskra.

Les analyses phytochimiques menées durant cette étude afin de déterminer les teneurs en composés phénoliques (polyphénols et flavonoïdes totaux) et les activités antioxydantes des extraits secs de la partie aérienne entière d'*E.granulata* et les cinq organes d'*E.retusa* (racines, tiges, feuilles, capsules et graines).

Par ailleurs, la solubilité des polyphénols dans les solvants d'extraction est un paramètre très important qui facilite la disponibilité des molécules recherchées, en utilisant séparément trois solvants de différente polarité; acétate d'éthyle, méthanol et eau distillée pour extraire le maximum de composantes au moyen de soxhlet. Les solvants sont évaporés par le rota vapeur pour obtenir des extraits secs dont le nombre est de 18 extraits.

La teneur en polyphénols et en flavonoïdes et la détermination de la capacité antioxydante de ces extraits par les tests de; DPPH, ABTS<sup>++</sup>, pouvoir réducteur et réduction du cuivre (CUPRAC) ont été évalués sur tous les extraits. Alors que, l'activité de blanchissement du  $\beta$ -carotène a été déterminée uniquement sur les extraits d'*E. retusa* et l'activité de la chélation des ions ferreux n'a été examiné que sur les extraits d'*E.granulata*. De plus, nous avons étudié le pouvoir photoprotective des extraits d'*E.retusa* par l'évaluation de la valeur du facteur de protection solaire.

Les résultats obtenus ont montré une variabilité significative des teneurs en polyphénols, en flavonoïdes et des activités antioxydantes entre les extraits de chaque espèce de plante.

En effet, les résultats de la première partie expérimentale de l'étude phytochimique sur les extraits d'*E.granulata* ont montré que l'extrait méthanolique qui présente des teneurs élevées en polyphénols et en flavonoïdes totaux se caractérise par une capacité importante de piéger les radicaux libres du DPPH<sup>\*</sup>, de neutraliser le radical cationique ABTS<sup>++</sup> et de réduire le fer. Par contre, la capacité de réduire le cuivre et de chélater les ions ferreux est importante

chez l'extrait aqueux de faible valeur en polyphénols par rapport à l'extrait méthanolique. Donc, on peut dire que, l'activité antioxydante probablement n'est pas liée seulement à la teneur en polyphénols mais à la structure et à l'interaction entre certaines composantes. En outre, l'extrait d'acétate d'éthyle a une teneur en polyphénols faible avec une pauvreté en flavonoïdes totaux solubles dans le solvant d'extraction et aussi il a une activité antioxydante faible par rapport aux deux autres.

Les résultats de la deuxième partie expérimentale de l'étude phytochimique sur les organes d'*E.retusa* ont montré que les trois extraits de graines (aqueux, méthanolique et acétate d'éthyle) avec l'extrait d'acétate d'éthyle des capsules présentent les teneurs les plus élevées en polyphénols et en flavonoïdes. Alors que, les trois extraits d'acétate d'éthyle des racines, des tiges et des feuilles donnent une faible teneur en polyphénols. Ces extraits aussi ont des teneurs en flavonoïdes plus faibles à piètres chez l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles. Concernant l'activité antioxydant, généralement les graines donnent un pouvoir antioxydant important pour les cinq activités testées, en plus l'extrait aqueux des racines possède une activité antiradicalaire et un pouvoir inhibiteur du blanchiment de la  $\beta$ -carotène plus puissants malgré leur teneur faible en polyphénols en comparaison avec les graines et les capsules ce qui affirme une autre fois que, l'activité antioxydante est due à la structure et à l'interaction entre certaines composantes.

En outre, la valeur du facteur de protection solaire la plus importante est enregistrée chez les deux extraits méthanoliques et aqueux des graines. Ainsi, à partir de nos résultats, la teneur en flavonoïdes n'est pas un facteur limitant qui influe sur l'activité photoprotective.

Il ressort ainsi que, l'analyse par CLHP des composés phénoliques pour la première fois sur les trois extraits méthanoliques: la partie aérienne d'*E. granulata*, les graines et les capsules d'*E.retusa* a permis d'identifier de nombreux composés d'intérêt antioxydant important. L'extrait méthanolique de la partie aérienne d'*E.granulata* a dévoilé que le composé majoritaire est l'acide caféique et l'identification des composés phénoliques des deux extraits méthanoliques des graines et des capsules a démontré que le composé majoritaire est l'Epigallocatechin 3-O- Gallate.

Finalement, cette étude a permis de découvrir que les deux espèces de plantes sont très riches en polyphénols, les quelles ont des activités antioxydantes connues par leurs efficacité dans le traitement de nombreuses maladies. Donc, cette étude scientifique confirme la valeur thérapeutique de ces deux plantes et justifiée leurs usages en médecine traditionnelle.

Toutefois, les résultats obtenus ouvrent également d'autres perspectives pour compléter ce modeste travail *in vitro* par l'identification, l'isolement et la purification des composés phénoliques qui ont des propriétés antioxydantes et photoprotectives. En outre, les études antimicrobiennes, antifongiques, enzymatiques *in vitro* sont nécessaires à réaliser. L'activité antioxydante sur les cellules endothéliales humaines soumises à des situations de stress oxydatif peut confirmer aussi le pouvoir antioxydant.

De même, l'étude de la toxicité des molécules s'impose avant toute utilisation pour la santé humaine.

### Références bibliographiques

- 1- Abd Hamid, H., Mutazah, R., Yusoff , M.M., Abd Karim, N.A., Abdull Razis, A.F. (2017). Comparative analysis of antioxidant and antiproliferative activities of *Rhodomyrtus tomentosa* extracts prepared with various solvents. *Food and Chemical Toxicology*. 451-457.
- 2- Abdallah, E.M. (2014). Antimicrobial properties and phytochemical constituents of the methanol extracts of *Euphorbia retusa* Forssk. and *Euphorbia terracina* L. from Saudi Arabia. *South Asian J Exp Biol*.4 (2): 48-53.
- 3- Abu Arra,B., Zuraini,Z., Lacimanan, Y.L, Sreenivasan, S. (2011). Antioxidant activity and phytochemical screening of the methanol extracts of *Euphorbia hirta* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 386-390.
- 4- Afssaps. (2011).Recommandations de bon usage des produits de protection solaire à l'attention des utilisateurs. URL: <http://ansm.sante.fr/var/ansm-site/storage/original/application/7dff1bdc58ff373048961896c9c72db5.pdf>.
- 5- Ahmad, I., Khan,A.U., Chaudhary,B.A., Janbaz,K.H., Uzair,M., Akhtar,M., Gilani ,A.H. (2012). Antifungal and antispasmodic activities of the extracts of *Euphorbia granulate*. *Journal of Medicinal Plants Research*. 6(1): 19-23.
- 6- Ajayi, E.I.O., Adeleke, M.A., Adewumi, T.Y., Adeyemi, A.A.(2017) Antiplasmodial activities of ethanol extracts of *Euphorbia hirta* whole plant and *Vernonia amygdalina* leaves in plasmodium berghei-infected mice. *Journal of Taibah University for Science*. 11(6): 831–835.
- 7- Alaklabi, A., Arif, I.A., Ahamedb, A., Kumar, R.S., Idhayadhulla A. (2017). Evaluation of antioxidant and anticancer activities of chemical constituents of the *Saururus chinensis* root extracts. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 25: 1387–1392
- 8- Albayrak, S., Aksoy, A.(2019). Phenolic contents and biological activity of endemic *Origanum minutiflorum* grown in Turkey. *Indian J of Pharmaceutical Education and Research*. 53(1):160-70.
- 9- Altun, M.L., Yilmaz,B.S., Orhan, I.E., Citoglu, G. (2013). Assessment of Cholinesterase and Tyrosinase Inhibitory and Antioxidant Effects of *Hypericum Perforatum* L . ( St . John ’ S Wort ). *Industrial Crops & Products*. 43: 87–92.

- 10- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. and Karademir, SE. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J Agric Food Chem.* 52:7970-7981.
- 11- Asha, S., Thirunavukkarasu, P., Magendira Mani, V., Sadiq, a. M. (2016). Antioxidant activity of *Euphorbia hirta* Linn. Leaves extracts. *European Journal of Medicinal Plants.* 14(1): 1-14.
- 12- Ashraf, A., Adil Sarfraz, R., Rashid, M. A., Shahid, M. (2015). Antioxidant, antimicrobial, antitumor, and cytotoxic activities of an important medicinal plant (*Euphorbia royleana*) from Pakistan. *Journal of food and drug analysis.* 23: 109 -115.
- 13- Awaad, A. S., Alothman, M. R., Zain, Z. Y., Zain, G. M., Alqasoumi, S. I., Hassan, D. A. (2017). Comparative nutritional value and antimicrobial activities between three *Euphorbia* species growing in Saudi Arabia. *Saudi Pharmaceutical Journal.* 25:1226–1230.
- 14- Baldosano, H. Y, Castillo M. B. M. G, Elloran C. D. H., Bacani F. T. (2015). Effect of Particle Size , Solvent and Extraction time on tannin extract from *Spondias Purpurea* Bark Through Soxhlet Extraction. *Proceedings of the DLSU Research Congress* 3: 4–9
- 15- Barchan, A., Bakkali, M., Arakrak, A., Pagán, R., Laglaoui, A. (2014). The effects of solvents polarity on the phenolic contents and antioxidant activity of three *Mentha* species extracts. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 3(11):399 -412.
- 16- Beddou, F. (2015). Etude phytochimique et activités biologique de deux plantes médicinales sahariennes *Rumex vesicarius* L. et *Anvillea radiata* Coss. & Dur. Thèse de Doctorat. Université Abou beker Belkaid. Tlemcen. Algerie. 143p.
- 17- Benabdallah, H. (2016). Polycopié du Cours: Techniques d'extraction, de purification et de conservation. Master I: Analyses biochimiques. Université Ferhat Abbas de Sétif. 77p.
- 18- Benchelah, A. C., Bouziane, H., Maka, M., Ouahes, C. (2000). *Fleurs du Sahara*. Ibis Press. Paris.
- 19- Bengouga, K. (2018). Evaluation de la résistance naturelle de quelques cultivars de fève (*Vicia faba* L.) propres à la région de Biskra à l'égard des thrips (Thysanoptera: Thripidae). Thèse de doctorat en Sciences Agronomiques. Université Mohamed Khider. Biskra. 69p.

- 20- Benhammou, N. (2011). Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Thèse de Doctorat. Université Abou beker Belkaid. Tlemcen. Algérie. 108p.
- 21- Benrhouma-Martin, G. (2013). Oligomérisation enzymatique de flavonoïdes et évaluation des activités biologiques des oligomères synthétisés. Thèse en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en « Sciences Biologiques et Biotechnologies » et Doctorat en « Procédés Biotechnologiques et Alimentaires. Université de Monastir et Université de Lorraine. 171p.
- 22- Bensouici, C. (2015). Etude phytochimique et évaluation des activités biologiques de deux plantes du genre *Sedum* (Crassulaceae). Thèse de Doctorat. Université freres mentouri constantine. Algérie. 222p.
- 23- Bimakr, M., Rahman, A. R., Taip, F. S., Ganjloob A., Med Salleh, A., M.L Selamat, J., Hamid, A., Zaidul, I.S. M. (2010). Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint ( *Mentha Spicata* L .) Leaves. *Food and Bioproducts Processing*. 9: 67-72.
- 24- Blois, M.S.(1958). Antioxidant determinations by the use of a stable Free Radical. *Nature*. 461:1119-1200.
- 25- Borg , J., Reeber, A.(2008). Biochimie métabolique . 2ème édition Ellipses. pp : 257-274
- 26- Bousselessela, H., Yahia, M., Mahboubi, A., Benbia S., Yahia. M.(2012). Antioxydant and antibacterial activity of alkaloids and terpenes extracts from *Euphorbia granulate*. *International Scholarly and Scientific Research & Innovation*. 7(3) : 166-169.
- 27- Brunet, C., 2014. Evaluation du bon usage des produits de protection solaire et conseils à l'officine. Université de Poitiers. Faculté de médecine et de pharmacie. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. 130p.
- 28- Bruneton J. (2005). Plantes toxiques. Végétaux dangereux pour l'homme et les animaux : Tec & Doc Lavoisier. 3ème édition.
- 29- Chaisawangwong, W., Gritsanapan.W. (2009). Extraction method for high free radical scavenging activity of siamese neem tree flowers. *Songklanakarin J. Sci. Technol*. 31(4): 419-23.

- 30- Chandel, M., Sharma, U., Kumar, N., Singh, B., Kaur, S. (2012). Antioxidant activity and identification of bioactive compounds from leaves of *Anthocephalus cadamba* by ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time of flight mass spectrometry. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 977-985.
- 31- Chen, G.H., Lin, Y.L., Hsu, W.L., Hsieh, S.K., Tzen, J.T.C. (2015). Significant elevation of antiviral activity of strictinin from Pu'er tea after thermal degradation to ellagic acid and gallic acid. *Journal of food and drug analysis*. 23:116 -123.
- 32- Chikhi, I. (2013). Composition chimique et activités biologiques des extraits de cinq plantes aromatiques et médicinales de l'ouest d'Algérie. Thèse de doctorat de 3ème cycle en Chimie. Université Abou Bekr Belkaid – Tlemcen. 120p.
- 33- Coulibaly, A.Y., Hashim, R., Sulaiman, S.F., Sulaiman, O., Ping Ang, L.Z., Ooi, K.L. (2014). Bioprospecting medicinal plants for antioxidant components. *Asian Pac J Trop Med*. 7(Suppl 1): 553-559.
- 34- Dari, A. (2016). Technique chromatographiques. [http:// lpagrocasa.e-monsite.com/medias/ files/module-m-53.pdf](http://lpagrocasa.e-monsite.com/medias/files/module-m-53.pdf).
- 35- Das, M., Mondal, S., Banerjee, S., Bandyopadhyay, A. (2017). Assessment of Sun Protection Factor from the leaf extract of *Desmodium gangeticum* (L). *RJPBCS*. 8(4):782-788.
- 36- De Souza, M.Q., Nogueira Teotônio, I.M.S., De Almeida, F.C., Heyn, G.S., Alves, P.S., Romeiro, L.A.S., Pratesi, R., De Medeiros Nóbrega, Y.K. Pratesi, C.B. (2018). Molecular evaluation of anti-inflammatory activity of phenolic lipid extracted from cashew nut shell liquid (CNSL). *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 18:181.
- 37- Decary, R. (1966). Les emplois des Euphorbiaceae malgaches. *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée*. pp. 467-473.
- 38- Decker, E. A., Welch, B. (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 38: 674–677.
- 39- Demnati F. (2013). Biodiversité et enjeux socio-économiques des lacs salés (Chotts et Sebkhass) d'Algérie. Cas du Chott Merouane et Melghir. Thèse de doctorat. Université de Biskra. 109p.



- 40- Desmier. (2016). Les antioxydants de nos jours : définition et applications. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université de limoges.87p.
- 41- Djeghim, H. (2016) Etude phytochimique et biologique d'une plante médicinale Algérienne du Genre *Genista* (Fabaceae). Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master. 73p.
- 42- Dupont, F., Guignard, J.L. (2012). Botanique : les familles de plantes. 15 ème édditi. Elsevier Masson. pp. 60-79.
- 43- Falleh ,H., Ksouri,R., Chaieb, K. , Karray-Bouraoui , N., Trabelsi,N. , Boulaaba,M. , Abdelly,C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs and their biological activities. *C. R. Biologies* .331:372–379.
- 44- Falleh, H., Jalleli,I., Ksouri, R., Boulaaba, M., Guyot,S., Magné,C., Abdelly, C. (2012 a). Effect of salt treatment on phenolic compounds and antioxidant activity of two *Mesembryanthemum edule* provenances. *Plant Physiology and Biochemistry*. 52: 1-8.
- 45- Falleh, H., Ksouri, R ., Medini, F., Guyot, S., Abdelly,C., Magné C. (2011). Antioxidant activity and phenolic composition of the medicinal and edible halophyte *Mesembryanthemum edule* L. *Industrial Crops and Products* 34:1066– 1071.
- 46- Falleh, H., Ksouri, R., Boulaaba, M., Guyot, S., Abdelly, C., Magné, C. (2012 b). Phenolic nature, occurrence and polymerization degree as marker of environmental adaptation in the edible halophyte *Mesembryanthemum edule*. *South African Journal of Botany*. 79: 117–124.
- 47- Falleh, H.,Ksouri, R., Oueslati, S.,Guyot, S., Magné, C., Abdelly ,C. (2009). Interspecific variability of antioxidant activities and phenolic composition in *Mesembryanthemum* genus. *Food and Chemical Toxicology*. 47 : 2308–2313.
- 48- Favier A. (2003). Le stress oxydant. « Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique ». <http://www.andrecontrelasla.be/IMG/pdf/Favier.pdf>.
- 49- Fernandes, F. H. A. et Salgado H. R. N. (2016). Gallic Acid: Review of the methods of determination and quantification. *Critical reviews in analytical chemistry*. 3: 257–265.
- 50-Fidelis,T.(2001). Valorisation des polyphénols végétaux Dans l'alimentation [file:///C:/Documents%20Settings/Administrateur/Mes%20documents/ Downloads/53971e7709d0a%20\(1\). pdf](file:///C:/Documents%20Settings/Administrateur/Mes%20documents/Downloads/53971e7709d0a%20(1).pdf).

- 51- Filippi,A., Picot,T., Aanei, C.M., Nagy, ., Szöllősi, ., Campos, L., Ganea, C., Mocanu, M.M. (2017). Epigallocatechin-3-O-gallate alleviates the malignant phenotype in A-431 epidermoid and SKBR- 3 breast cancer cell lines. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 1465-3478.
- 52- Frohne, D., Fander, H .J.P R., Anton .(2009). Plantes à risques. Tec & Doc Lavoisier.
- 53- Ganeshpurkar, A., Saluja, A. K. (2017). The Pharmacological Potential of Rutin. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 25: 149–164.
- 54- Gasmi, A., Benabderrahim, M.A., Guasmi, F., Elfalleh, W., Triki, T., Zammouri, T., Ferchichi, A. (2019). Phenolic profiling, sugar composition and antioxidant capacity of arta (*Calligonum comosum* L.), a wild Tunisian desert plant. *Ind Crop Prod*. 130: 436–442.
- 55- Ghareeb ,T.A., El-Toumy, S.A., El – Gendy, H., Haggag, E.G. (2018). Secondary metabolites and hepatoprotective activity of *Euphorbia retusa*. *JAPR*. 2 (4): 283-291.
- 56- Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*. 4: 162-169.
- 57-Goga, A., Hasić, S., Bećirović, Š., Ćavar, S. (2012). Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts of *Nigella sativa* L. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina* 39: 15–19.
- 58- Green RJ (2004). Antioxidant activity of peanut plant tissues. Masters Thesis. North Carolina State University. USA. 82p.
- 59- Haba, H., Lavaud, C., Magid, A.A., Benkhaled, M.(2009). Diterpenoids and Triterpenoids from *Euphorbia retusa*. *J Nat Prod*. 72(7): 1258–1264.
- 60- Haleng,J., Pincemail,J., Defraigne, J.O., Charlier,C., Chapelle,J.P. (2007). Le stress oxidant. *Rev Med Liege*. 62 (10): 628-638.
- 61- Hameed, H., Aydin, S., Başaran, N. (2016). Sinapic Acid: is it safe for humans?. *FABAD J. Pharm. Sci*. 41 : 39-49.
- 62- Hamidi, A.(2013). Etude phytochimique et activité biologique de la plante *limoniastrum guyonianum* . Mémoire de magister en chimie organique. Universite kasdi merbah Ouargla. 85p.

- 63- Hammiche, V., Maiza, K. (2006). Traditional medicine in Central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *Journal of Ethnopharmacology*.105: 358–367.
- 64- Ho, T. Y.(2001). Sunscreens: Is looking at Sun Protection Factor Enough?. *Hong Kong Dermatology & Venereology Bulletin*. 9 (3): 100-108.
- 65- Hopkins, W.G. (2003). Physiologie végétale.2 eme edition.De Boeck.
- 66- Hossan, M.S., Rahman, S., Bashar1,A.B.M.A., Jahan, R., Al-Nahain, A., Rahmatullah, M.1. (2014). Rosmarinic acid: a review of its anticancer action. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*. 3(9):57-70.
- 67- Hou, XR., Wan, LL., Zhan, ZJ., Li, CP., Shan, WG.(2011). Analysis and determination of diterpenoids in unprocessed and processed *Euphorbia lathyris* seeds by HPLC-ESI-MS. *J Pharm Anal*. 1(3):197-202.
- 68- Ibrahim Elshamy, A., El-Shazly,M., Mahmoud Yassine, Y., El-Bana,M.A., Farrag,A., Nassar,M.I. , Singab,A.N., Noji,M., Umeyama, A.(2017). Phenolic constituents, anti-inflammatory and antidiabetic activities of *Cyperus laevigatus* L. *Pharmacogn J*. 9(6):828-833.
- 69- Im, M., Kim,S.Y., Sohn,K.C., Choi,D.K., Lee,Y., Seo,Y.I., Kim,C.D, Hwang,Y.L., Zouboulis,C.C., Lee,J.H. (2012). Epigallocatechin-3-Gallate suppresses IGF-I-Induced lipogenesis and cytokine expression in SZ95 sebocytes. *Journal of Investigative Dermatology*. *Journal of Investigative Dermatology*.132: 2700–2708.
- 70- INRS.2005. Les solvants. [www.INRS.fr.12p](http://www.INRS.fr.12p).
- 71- INRS.2010. Les solvants. [www.INRS.fr.8p](http://www.INRS.fr.8p).
- 72- Joshi, P.A., Pilley, H.H, Wadegaonkar,V.P., Wadegaonkar,P.A. (2015). Comparative assessment of antioxidant potential of *cassia auriculata* (linn.) flower, leaf and seed methanolic extracts. *Int j pharm pharm sci*, 7 (9): 381-385.
- 73- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg. E.A., Stevens P. (2002). Botanique systématique: une perspective phylogénétique.De Boeck. 1<sup>re</sup> édition.

- 74- Kalidindi, N., Thimmaiah, N.V., Jagadeesh, N.V., Nandee, R., Swetha, S., Kalidindi, B. (2015). Antifungal and antioxidant activities of organic and aqueous extracts of *Annona squamosa* Linn. leaves. *J. Food Drug Anal.* 23: 795–802.
- 75- Kaplaner, E., Singeç, M.H., Öztürk, M. (2017). Fatty Acid composition and antioxidant activity of *Tricholoma imbricatum* and *T. Focale*. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology.* 5(9): 1080-1085.
- 76- Karoune, S., Falleh, H., Kechebar, M.S., Halis, Y., Mkadmini, K., Belhamra, M., Rahmoune, C., Ksouri. (2015). Evaluation of antioxidant activities of the edible and medicinal *Acacia albida* Organs related to phenolic compounds. *Natural Product Research.* 29: 452-454.
- 77- Karoune, S., Kechebar, M.S.A., Djellouli, A., Belhamra, M., Rahmoune, C., Ksouri, R. (2016). Variability of antioxidant properties and identification of phenolic contents by HPLC-DAD in different organs of *Acacia albida* and *Acacia raddiana*. *IJPPR.* 8(5): 701-709.
- 78- Khiralla, A., Mohamed, I., Thomas, J., Mignard, B., Spina, R., Yagi, S., Laurain-Mattar, D. (2015). A pilot study of antioxidant potential of endophytic fungi from some Sudanese medicinal plants. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine.* 8(9): 701–704.
- 79- Khouchlaa, A., Talbaoui, A., El Idrissi, A. E. Y., Bouyahya, A., Lahsen, S. A., Kahouadji, A., Tijane, M. (2018). Détermination des composés phénoliques et évaluation de l'activité litholytique in vitro sur la lithiase urinaire d'extrait de *Zizyphus lotus* L. d'origine marocaine. *Phytothérapie.* 16(1), 14–19.
- 80- Ksouri, R., Falleh, H., Megdiche, W., Trabelsi, N., Hamdi, B., Chaieb, K., Bakhrouf, A., Magné, C., Abdelly, C. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L and related polyphenolic constituents. *Food Chem. Toxicol.* 47, 2083-2091.
- 81- Ksouri, R., Megdiche, W., Falleh, H., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Smaoui, A., Abdelly, C. (2008). Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian Halophytes. *C. R. Biologies.* 331(11): 865–73.
- 82- Labed, I. (2015). Composition chimique et évaluation des activités biologiques des huiles essentielles de *Pistacia atlantica* Desf. et de *Ferula vesceritensis* Coss. & Dur. et synthèse catalytique de nouveaux dérivés pipéridiniques. Thèse de Doctorat troisième cycle (LMD).

Spécialité: Chimie pharmaceutique. Université des frères mentouri-constantine. 165p.

83- Lahmadi, S., Guesmia, H., Zeguerrou, R. (2017). Flore de la plaine d'El Outaya. Deuxième édition (mise à jour). Ain M'lila. Algérie.

84- Le Floch, E., Boulos, L., Vela, E. (2010). Catalogue synonymique commenté de la flore de Tunisie. Banque nationale de gènes.

85- Lee, S.J., Kang, H.W., Lee, S.Y., Hur, S.J. Green. (2004). Tea polyphenol Epigallocatechin-3-O-Gallate attenuates lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW264.7 Cells. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2 (7): 425-428.

86- Lefahal, M., Zaabat, N., Ayad, R., Makhloufi, E., Djarri, L., Benahmed, M., Laouer, H., Nieto, G., Akkal, S. (2018). In vitro assessment of total phenolic and flavonoid contents, antioxidant and photoprotective activities of crude Methanolic extract of aerial parts of *Capnophyllum peregrinum* (L.) Lange (Apiaceae) growing in Algeria. *Medicines*. 2(5): 2-10.

87- Lin, C.M., Chang, H., Wang, B.W., Shyu, K.G. (2016). Suppressive effect of epigallocatechin-3-O-gallate on endoglin molecular regulation in myocardial fibrosis in vitro and in vivo. *J. Cell. Mol. Med.* 20 (11): 2045-2055.

88- M'HIRI, N. (2015). Étude comparative de l'effet des méthodes d'extraction sur les phénols et l'activité antioxydante des extraits des écorces de l'orange «Maltaise demi sanguine» et exploration de l'effet Inhibiteur de la corrosion de l'acier au carbone. *Thèse de Doctorat en «Procédés Biotechnologiques et Alimentaires» Doctorat en «Procédés Biotechnologiques et Alimentaires»*. Université de Carthage et Université de Lorraine. 147p.

89- Macheix, J.J., Fleuriet, C., Jay-Allemand, C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux: Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Italie. Press polytechnique et universitaires romandes.

90- Mansur, J. S., Breder, M. N. R., Mansur, M. C. A and Azulay, R. D. (1986.) Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *An Bras Dermatol.* 61:121-124.

91- Marco, G.J., 1968. A rapid method for evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 45: 594-598.

- 92- Marinova, E.M., Yanishlieva, N.V., (2003). Antioxidant activity and mechanism of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures. *Food Chem* 81(2): 189–197.
- 93- Matsumura, K., Takayama, H., Bae, J.Y., Kurihara, M., Tsutsumi, S., Hyon, S.H. (2009). Preservation of platelets by adding Epigallocatechin-3-O-Gallate to platelet concentrates. *Cell transplantation*. 18: 521–528.
- 94- Mbanga, L., Mpiana, P.T., Mumbwa, A.M., Bokolo, K., Mvingu, I.K., Ngoy, B., Muwawa, K. Mulenga, M. (2014). Sun Protection Factor (SPF) Determination of Cosmetic Formulations Made in Kinshasa (DR Congo) by In-Vitro method using UV-VIS spectrophotometer. *J. of physical and chemical sciences*. 1-5.
- 95- Mehra, P., Koul, A., Bansal, D.D. (2013). Studies on Antioxidant role of (+)-Catechin Hydrate in high sucrose high fat diet induced oxidative stress. *Am. J. Biomed. Sci.* 5(2):161–170.
- 96- Meyer, S., Reeb, C., Bosdeveix, R. 2004. *Botanique: Biologie et physiologie végétales*. Maloine. Paris.
- 97- Moreno, M.I.V., Isla, M.I., Sampietro, A.R., Vattuone, M.A. (2000). Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology* .71: 109–114.
- 98- Moualek, I., Aiche, G.I., Mestar Guechaoui, N., Lahcene, S., Houali, K., (2016). Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Arbutus unedo* aqueous extract. *Asian Pac J Trop Biomed* .6(11): 937–944.
- 99- Muanda, F.N. (2010). Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur de l'université Paul Verlaine-Metz. Ecole Doctorale Sésames. 232p.
- 100- Müller, L., Gnoyke, S., Popken, A.M., Böhm, V. (2010). Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT - Food Science and Technology*. 43: 992–999.
- 101- Napagoda, M.T., Malkanthi, B. M. A. S., Abayawardana, S.A. K. Qader, M.M., Jayasinghe L. (2016). Photoprotective potential in some medicinal plants used to treat skin diseases in Sri Lanka. *BMC Complement Altern Med*. 16(1):1–6.

- 102- Nauman, m., Kale, R. K., Rana, P. Singh. (2018). Polyphenols of *Salix aegyptiaca* modulate the activities of drug metabolizing and antioxidant enzymes, and level of lipid peroxidation. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 18:81. 1-12.
- 103- Omar Bakr, R., El Bishbishy, M.H. (2016). Profile of bioactive compounds of *Capparis spinosa* var. *aegyptiaca* growing in Egypt. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 26: 514–520.
- 104- Oueslati S. (2013). Exploration de la variabilité de la composition phénolique et des activités biologiques chez quatre halophytes du genre *Suaeda*. These de doctorat en sciences biologiques. Université de Tunis El Manar. 134p.
- 105- Oueslatia, S., Trabelsia, N., Boulaabaa, M., n Legault, J., Abdellya, C., Ksouri, R. (2012). Evaluation of antioxidant activities of the edible and medicinal *Suaeda* species and related phenolic compounds. *Industrial Crops and Products* 36:513–518.
- 106- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*. 44: 307–315.
- 107- Ozenda, P. (2004). Flore du Sahara. 2<sup>ème</sup> Ed. CNRS.
- 108- Öztürk, M., Aydogmus, F., Emin Duru, M., Topçu. (2007). Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): An edible medicinal plant. *Food Chemistry* 103. 623–630.
- 109- Öztürk, M., Kolak, U., Topcu, G., Oksuz, S., Choudhary, M.I. (2011) Antioxidant and anticholinesterase active constituents from *Micromeria cilicica* by radical-scavenging activity-guided fractionation. *Food Chemistry*. 126 31–38.
- 110- Parvaiz, A., Cheruth, A.J., Azooz, M.M., Gowher, N. (2009). Generation of ROS and non enzymatic antioxidants during abiotic stress in plants Generation of ROS and non-enzymatic antioxidants during abiotic stress in plants. *Bot Res Int.*;11-20.
- 111- Patrascu C. (2010.) L'utilisation des solvants en entreprise. INRS. <http://sante.travail.free.fr/smt6/communic/2009-2010/2010-03-09/Solvants-INRS.pdf>.
- 112- Pei, K., Ou, J., Huang, J., Oua, S. (2015). p-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. *J Sci Food Agric*. 96: 2952–2962.

- 113- Penchev, P.V. (2010). Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse. 216p.
- 114- Perumal, S., Mahmud, R., Ramanathan, S. (2015): Anti-infective potential of caffeic acid and epicatechin 3-gallate isolated from methanol extract of *Euphorbia hirta* (L.) against *Pseudomonas aeruginosa*. *Natural Product Research*. 29(18), 1766–1769.
- 115- Pessel, F. (2013). Synthèse éco-compatible de flavonoïdes fonctionnalisés par le glucose comme antioxydants potentiels. Thèse de doctorat. Université Paris Sud - Paris XI, Français. 173p.
- 116- Pióro-jabrucka, E., Pawełczak, A., Przybył, J.L., Bączek, K., Węglarz, Z. (2011). Accumulation of phenolic and sterol compounds in *Euphorbia hirta* (L.). *Herba polonica*. 57(2):30-37.
- 117- Prashant, Y.M., Shital, S.P. (2017a). *Euphorbia nerifolia* L.: Review on botany, ethnomedicinal uses, phytochemistry and biological activities. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 10(5): 430–438.
- 118- Prashant, Y.M., Shital, S.P. (2017b). *Euphorbia tirucalli* L.: Review on morphology, medicinal uses, phytochemistry and pharmacological activities. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 7(7): 603-613.
- 119- Proestos, C., Boziaris, I. S., Nychas, G. J. E., Komaitis, M. (2006). Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chemistry*. 95 : 664–671.
- 120- Quezel, P., Santa, S. (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed CNRS. T2. Paris. pp. 598-599.
- 121- Raimundo, G. O. J., Camila, D. S., Grasielly, R.S., Amanda, L.G., Ana, P.O., Sarah, R. G.L.S., Amanda, C. S. M., Jéssica, Sousa, R. S., and Jackson, R. G. S. A. (2013). In vitro antioxidant and photoprotective activities of dried extracts from *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 3:122-127.



- 122- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans C.(1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Bio Med.* 26:1231–1237.
- 123- Reynaud J. (2011). Botanique : comprendre la botanique (Histoire, évolution, systématique). Ellipses. pp.11-26.238 p.
- 124- Rivero, R.M., Ruiz, J.M0, Garc1, P.C., Lopez-Lefebvre, L.R., Sanchez, E., Romero, L. (2001). Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Sci.* 160:315-321.
- 125- Saeed, N., Khan, M.R., Shabbir, M. (2012). Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *Complementary and Alternative Medicine.* 221:1-12.
- 126- Sahki, A., Sahki Boitemmine., R. 2004 : le Hoggar promenade botanique. Ed Esope.
- 127- Saleem, H., Ahmad, I., Gill, M.S.A.(2015). Phytochemical screening and diuretic activity of *Euphorbia granulata*. *Bangladesh J Pharmacol.* 10: 584-587.
- 128- Sardsaengjun, C., Jutiviboonsuk, A. (2015). Effect of temperature and duration time on polyphenols extract of *areca catechu* Linn. seeds. *Thai Pharmaceutical and Health Science Journal.* 14–17.
- 129- Schalka, S et Reis VMS. (2011). An bras dermatol. Sun protection factor: meaning and controversies. 86(3):507-715.
- 130- Sdayria, J., Rjeibi, I., Feriani, A., Ncib, S., Bouguerra, W., Hfaiedh, N., Elfeki, A., Allagui, M.S. (2019). Chemical Composition and Antioxidant, Analgesic, and Anti-Inflammatory Effects of Methanolic Extract of *Euphorbia retusa* in Mice. *Pain Research and Management.* 2018:1-11.
- 131- Sharma, N., Samarakoon, K.W., Gyawali, R., Park, Y.H., Lee, S.J., Oh, S.J., Lee, T.H., Jeong, D.K. (2014). Evaluation of the antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer activities of *Euphorbia hirta* ethanolic Extract. *Molecules.*19:14567-14581.
- 132- Sharma, S., Pal Vig, A.(2013). Evaluation of in vitro antioxidant properties of methanol and aqueous extracts of *Parkinsonia aculeata* L. leaves. *The Scientific World Journal The Scientific World Journa.*1-7.

- 133- Sharma, V., Janmeda, P. (2017). Extraction, isolation and identification of flavonoid from *Euphorbia nerifolia* leaves. *Arabian Journal of Chemistry*. 10(4): 509–514.
- 134- Shin, D., Kim, K.W., Chung, H.Y., Yoon, S., Moon, J.O.(2013). Effect of sinapic acid against dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats. *Arch. Pharm. Res.* 36:608–618.
- 135- Singleton, V.L., Rossi, J.A.J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult.* 16:144-158.
- 136- Smara, O., Julia, A., Moral-Salmi, C., Vigor, C., Vercauteren, J., Legseir, B. (2014). Flavonoïds from *Euphorbia guyoniana* Boissier & Reuter. *Journal of Life Sciences*. 8(6): 544-551.
- 137- Souza, S.M., Santos, A.T.D., Alves, V.C.A., Paula, O.A., Almeida, A.V.H., Alves, S.F.J., Crus, A.E.C.D., Silva, A.J.R.G.D., Santos, S.N.D., Santos, S.N.D., Pereira, N.X. (2015). Identification of flavonol glycosides and in vitro photoprotective and antioxidant activities of *Triplaris gardneriana* Wedd. *Journal of medicinal plant research* 9(7):207-215.
- 138- Spichiger, R.E., Savolainen, V.V., Filgeat, M., Jeanmonod, D. (2004). Botanique systématique des plantes à fleurs. 3<sup>e</sup> édition. pp 234.
- 139- Syed B. (2015). Le pouvoir antioxydant des additifs phytogéniques. *Biomini*. [https://www.biomini.net/uploads/tx\\_news/ART\\_No42\\_PHY\\_FR\\_0115.pdf](https://www.biomini.net/uploads/tx_news/ART_No42_PHY_FR_0115.pdf).
- 140- Tanveer, A., Khaliq, A., Javaid, M.M., Chaudhry, M.N., Awan, I. (2013). Implications of weeds of genus *Euphorbia* for crop production: a review. *Plantadaninha. viçosa-mg*. 31: 723-731.
- 141- Tel, G., Apaydin, M., Mehmet, E., Duruet, M.E. (2012). Antioxidant and Cholinesterase inhibition Activities of Three *Tricholoma* Species with Total Phenolic and Flavonoid Contents: The Edible Mushrooms from Anatolia. *Food Anal.* 5:495-504.
- 142- Tel, G., Ozturk, M., E. Duru, M., Turkoglu, A. (2015). Antioxidant and anticholinesterase activities of five wild mushroom species with total bioactive contents. *Pharm Biol.* 2015. 53(6): 824–830.
- 143- Tessier, A.M., Bouquet, A., Paris, R. R. (1975). Plantes médicinales et phytothérapie .sur quelques euphorbiacées toxiques africaines. Tome IX, N°= 3. Paris. p. 238-249.
- 144- Trabelsi, N., Megdiche, W., Oueslati, S., Bourgou, S, Hajlaoui, H., Abdelly, C. (2010). Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *LWT - Food Science and Technology* 43 :632–639.

- 145- Trabelsi, N., Oueslati,S., Falle,H., Waffo-Téguo,P., Papastamoulis,Y., Mérillon,J.M., Abdelly,C., Ksouri,R. (2012) Isolation of powerful antioxidants from the medicinal halophyte *Limoniastrum guyonianum*. *Food Chemistry*. 135: 1419–1424.
- 146- Trivedi, M.K., Branton, A., Trivedi, D., Nayak, G., Singh, R., Jana, S. (2015) Characterisation of physical, spectral and thermal properties of biofield treated resorcinol. *Organic Chem Curr Res*. 4(146):1-7.
- 147- Tunchaiyaphum, S., Eshtiaghi, M.N., Yoswathana, N. (2013). Extraction of bioactive compounds from Mango peels using green technology. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*. 4(4): 194-198.
- 148- Türkoğlu, A., Durub, M.E., Mercan, N. (2007). Antioxidant and Antimicrobial Activity of *Russula delica* Fr. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*. 2: 54-67.
- 149- Ullah, F., Naveed,I, Muhammad, A., Abdul,S., Ihsan, U., Sajjad, A., Muhammad, I.(2017). DPPH, ABTS free radical scavenging, antibacterial and phytochemical evaluation of crude methanolic extract and subsequent fractions of *Chenopodium botrys* aerial parts. *Pak J Pharm Sci*. 30(3):761-766.
- 150- Vidic, D., Tarić, E., Alagić, J., Maksimović M. (2014). Determination of total phenolic content and antioxidant activity of ethanol extracts from *Aloe* Spp. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina* 42: 5–10.
- 151- Wang, C.J., Jiang, Y.Q., Liu, D.H., Yan, X.H., Ma, S.C.(2013). Characterization of phloroglucinol derivatives and diterpenes in *Euphorbia ebracteolata* Hayata by utilizing ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Pharm Anal*. 3(4):292-297.
- 152- Wang,Y., Tang,C., Zhang, H. (2 0 1 5). Hepatoprotective effects of kaempferol 3-O-rutinoside and kaempferol 3-O-glucoside from *Carthamus tinctorius* L. on CCl<sub>4</sub>-induced oxidative liver injury in mice. *Jou rnal of food and drug analysis*.23: 31 0 -317.
- 153- Ye, J.H., Hsiao, M.W., Hsieh, C.H., Wu, W.C., Hung,Y.C., Chang, W.C. (2010). Analysis of caffeic acid extraction from *Ocimum gratissimum* linn. by high performance liquid chromatography and its effects on a cervical cancer cell line. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 49(3):266–271.

- 154- Yuki Sato, SI., Toshimitsu Kurokawa, J.O., Masaki Kobayashi, T.H., , Ken Iseki , M.S. (2011). In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International Journal of Pharmaceutics*. 403:136–138.
- 155- Zengin Kurt,B., Gazioğlu, Işıl., Sevgic, Ece., Sönmez, F. (2018). Anticholinesterase, antioxidant, antiaflatoxigenic activities of ten edible wild plants from Ordu Area, Turkey. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 17 (3): 1047-1056.
- 156- Zhang, H.M., Wang, C.F., Shen, S.M., Wang, G.L., Liu, P., Liu, Z.M., Liu, Z.M., Wang, Y.Y., Du, S.S., Liu, Z.L., Wei, Z. (2012). Antioxidant phenolic compounds from Pu-erh tea. *Molecules*. 17(12): 14037-14045.
- 157- Zielińska, M., Kostrzewa, A., Ignatowicz, E., Budzianowski, J.( 2001). The flavonoids, quercetin and isorhamnetin 3-O-acylglucosides diminish neutrophil oxidative metabolism and lipid peroxidation. *Acta Biochimica Polonica*. 48 (1):183–189.

## Annexe

**Annexe 1: Correlation entre l'effet érythémogène (EE) et l'intensité du rayonnement pour chaque longueur d'onde (I).**

Longueur d'onde ( $\lambda$ nm)	EE $\times$ I( $\lambda$ ) (Normalisée)
290	0.0150
295	0.0817
300	0.2874
305	0.3278
310	0.1864
315	0.0837
320	0.0180

**Annexe 2: Les absorbances moyennes de chaque extrait pour le test SPF**

	$\lambda$ (nm)	290	295	300	305	310	315	320
<b>Acétate d'éthyle</b>	<b>Raciness</b>	3.57	3.10	2.66	2.29	2.05	1.86	1.71
	<b>Tiges</b>	3.22	2.81	2.49	2.28	2.13	2.01	1.89
	<b>Feuilles</b>	3.07	2.89	2.71	2.62	2.58	2.57	2.55
	<b>Capsules</b>	2.63	2.65	2.64	2.65	2.66	2.66	2.64
	<b>Graines</b>	2.41	2.44	2.45	2.46	2.47	2.47	2.46
<b>Méthanol 70%</b>	<b>Raciness</b>	2.30	1.78	1.48	1.29	1.17	1.09	1.00
	<b>Tiges</b>	2.31	1.94	1.72	1.62	1.59	1.59	1.55
	<b>Feuilles</b>	2.55	2.19	1.97	1.86	1.83	1.80	1.76
	<b>Capsules</b>	2.31	1.95	1.74	1.60	1.54	1.53	1.54
	<b>Graines</b>	3.07	3.11	3.13	3.15	3.16	3.18	3.19
<b>Eau</b>	<b>Raciness</b>	2.10	1.62	1.32	1.15	1.04	0.95	0.87
	<b>Tiges</b>	2.46	2.08	1.85	1.76	1.74	1.74	1.75
	<b>Feuilles</b>	2.84	2.48	2.26	2.17	2.15	2.14	2.12
	<b>Capsules</b>	2.21	1.85	1.61	1.50	1.46	1.46	1.50
	<b>Graines</b>	3.85	3.86	3.85	3.82	3.80	3.78	3.75

**Annexe 3: Temps de rétention des standards de composés phénoliques (composés d'acides phénoliques et de flavonoïdes) utilisés par l'analyse de CLHP-DAD.**

N	Les Standards de composés phénoliques	Temps de rétention (min)
1	Acide ascorbique	4.414
2	Acide gallique	8.209
3	Résorcinol	10.308
4	Catéchol	12.034
5	Catéchine hydratée	14.307
6	Épigallocatechine	14.699
7	L'acide chlorogénique	15.752
8	Epicatechine 3 O gallate	16.267
9	Acide caféique	17.424
10	Acide syringique	17.802
11	acide p-coumarique	19.692
12	Acide sinapique	19.977
13	Acide férulique	20.23
14	Myricitrine	20.741
15	Lutéoline 7-O glucoside	20.937
16	Acide transhydroxycinnamique	20.942
17	La coumarine	20.995
18	Isorhamnetin 3 O glucoside	21.1
19	Resvératrol	21,737
20	Acide rosmarinique	21.753
21	Éther éthylique d'acide polytechnique	21.773
22	Oleuropéine	21.909

23	Isoquercitrine	21.925
24	L'acide ellagique	22.278
25	Myricetin	22.457
26	Kaempferol 3 O rutinoside	22.538
27	Isorhamnetin 3 O rutinoside	22.833
28	La quercétine	24.171
29	Naringenine	24.32
30	Acide trans cinnamique	24.36
31	Laricitrin	24.749
32	Lutéoline	24.787
33	Kaempferol	25.455
34	Isorhamnetin	25.762
35	Amentoflavone	26.873
36	Apigénine	25.897
37	Cirsimaritin	26.948

---



## Valorisation des résultats de la thèse

Les résultats relatés dans ce manuscrit ont fait l'objet de deux publications scientifiques dans des journaux internationaux à comité de lecture. Ces résultats ont également été valorisés scientifiquement par une communication affichée.

### 1- Publications scientifiques dans une revue

- catégorie A
- ISSN : 1478-6419online ISSN : 1478-6427.
- indexé au scopus et science citation index expanded.
- 2003- ongoing (H index =42)

❖ Selwa Lahmadi , Mohamed Belhamra , Samira Karoune , Kashi Imad , Chawki Bensouici , Mohamed Seif Allah Kechbar , Youcef Halis & Riadh Ksouri.2019. Phenolic constituents and antioxidant activity of *Euphorbia retusa* Forssk. Doi: 10.1080/14786419

### 2- Publications scientifiques dans une revue

- catégorie B
- ISSN : 07194250
- indexé au scopus et thomson reuters (emerging sources citation index)
- 2013- ongoing (H index =5)

❖ Selwa Lahmadi1, Mohamed Belhamra, Samira Karoune , Mohamed Seif Allah Kechbar, Chawki Bensouici, Imad Kashi, Ouahiba Mizab, Riadh Ksouri.2019. Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research. 7(5) : 356-366.

### Communication par affiche

- ❖ Selwa Lahmadi, Belhamra Mouhamed, Samira Karoune, Mouhamed seif allah Kechbar. Chawki Bensouici , Imad kaschi , and Riadh Ksouri. Evaluation of phenolic compounds of *Euphorbia.retusa* Forsk capsules..Agrosem 2.9-10 Décembre 2018.Département d'agronomie.université Mohamed Khider. Biskra.
- ❖ Selwa Lahmadi, Mohamed Belhamra, Mohamed seif allah Kechbar, Samira Karoune, Chawki Bensouici , Lynda Gali, Latifa Khatabi, Hasna Boural and Amina Chouh : Flavonoid contents and antioxidant activities in aqueous extracts of *Euphorbia retusa* Communication affichée dans le 1<sup>st</sup> international conference biodiversity in the service of biotechnologies.3-5 December, Mila, algeria



# *In vitro* antioxidant capacity of *Euphorbia retusa* Forssk. from Algerian desert

[Capacidad antioxidante *in vitro* de *Euphorbia retusa* Forssk. proveniente del desierto argelino]

Selwa Lahmadi<sup>1,2\*</sup>, Mohamed Belhamra<sup>1</sup>, Samira Karoune<sup>2</sup>, Mohamed Seif Allah Kechebar<sup>2</sup>, Chawki Bensouici<sup>3</sup>,  
Imad Kashi<sup>3</sup>, Ouahiba Mizab<sup>2</sup>, Riadh Ksouri<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Diversité des Ecosystèmes et Dynamiques des Systèmes de Production Agricoles en Zones Arides, Dépt d'Agronomie, Université Mohamed Khider, Biskra 07000, Algeria.

<sup>2</sup>Centre de Recherche Scientifique et Technique sur les Régions Arides, Campus Universitaire, BP 1682 R.P., Biskra 07000, Algeria.

<sup>3</sup>Centre de Recherche en Biotechnologie, Ali Mendjli Nouvelle Ville UV 03, Constantine 25000, Algeria.

<sup>4</sup>Laboratoire des Plantes aromatiques et médicinales, Centre de Biotechnologie de Borj-Cédria, BP 901, Hammam-Lif 2050, Tunisia.

\*E-mail: [lahmadi.selwa@crstra.dz](mailto:lahmadi.selwa@crstra.dz), [lahmadiagro@gmail.com](mailto:lahmadiagro@gmail.com)

## Abstract

**Context:** *Euphorbia retusa* Forssk. is a medicinal plant, which traditionally is used in Algerian Sahara for treatment of infantile eczema, warts and trichiasis.

**Aims:** To evaluate phenolic composition and antioxidant capacity of methanolic extracts from stems, leaves and seeds of *Euphorbia retusa*.

**Methods:** Total phenolic and flavonoids were analyzed by Folin-Ciocalteu and aluminum chloride assays, respectively using gallic acid (GA) and quercetin (Q) as standard compounds. Antioxidant capacity was studied *in vitro* by using DPPH and ABTS cation radical scavenging, cupric-reducing antioxidant capacity (CUPRAC) and reducing power assays, followed by identification of phenolic compounds of seeds by mean of high-performance liquid chromatography (HPLC-DAD).

**Results:** Methanolic extracts of *E. retusa* seeds had the highest total phenolic and flavonoid contents with  $315.50 \pm 1.41$   $\mu\text{g}$  GA equivalent/mg dry extract and  $91.83 \pm 8.18$   $\mu\text{g}$  Q equivalent/mg dry extract, respectively. Identification of phenolic compounds from seeds revealed that epigallocatechin 3-O-gallate was the major flavonoid. This organ showed the highest activity in the assays of DPPH ( $\text{IC}_{50} = 7.20 \pm 0.25$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), ABTS ( $\text{IC}_{50} < 6.25$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), CUPRAC ( $A_{0.5} = 10.64 \pm 0.99$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and reducing power ( $A_{0.5} = 11.84 \pm 1.72$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

**Conclusions:** *Euphorbia retusa* seeds have an antioxidant capacity that could be useful in pharmacological and medicinal fields.

**Keywords:** antioxidant; *Euphorbia retusa*; HPLC-DAD; phenolics.

## Resumen

**Contexto:** *Euphorbia retusa* Forssk. es una planta medicinal que tradicionalmente se utiliza en el Sahara argelino para el tratamiento del eccema infantil, verrugas y triquiasis.

**Objetivos:** Evaluar la composición fenólica y la capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de tallos, hojas y semillas de *Euphorbia retusa*.

**Métodos:** Los compuestos fenólicos y flavonoides totales se analizaron mediante ensayos de Folin-Ciocalteu y cloruro de aluminio, respectivamente, utilizando ácido gálico (GA) y quercetina (Q) como compuestos estándares. La capacidad antioxidante se estudió *in vitro* mediante la eliminación de radicales catiónicos DPPH y ABTS, los ensayos de capacidad antioxidante reductora cúprica (CUPRAC) y de potencia reductora, seguido de la identificación de compuestos fenólicos de semillas mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD).

**Resultados:** Los extractos metanólicos de las semillas de *E. retusa* tuvieron los contenidos más altos de fenoles y flavonoides totales con  $315.50 \pm 1.41$   $\mu\text{g}$  de GA equivalente/mg de extracto seco y  $91.83 \pm 8.18$   $\mu\text{g}$  de Q equivalente/mg de extracto seco, respectivamente. La identificación de compuestos fenólicos a partir de semillas reveló que la epigallocatequina 3-O-galato fue el principal flavonoide. Este órgano mostró la mayor capacidad antioxidante en los ensayos DPPH ( $\text{IC}_{50} = 7.20 \pm 0.25$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), ABTS ( $\text{IC}_{50} < 6.25$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), CUPRAC ( $A_{0.5} = 10.64 \pm 0.99$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y poder reductor ( $A_{0.5} = 11.84 \pm 1.72$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

**Conclusiones:** Las semillas de *Euphorbia retusa* tienen una capacidad antioxidante que podría ser útil en farmacología y medicina.

**Palabras Clave:** antioxidante; *Euphorbia retusa*; HPLC-DAD; fenoles.

## ARTICLE INFO

Received: March 7, 2019.

Received in revised form: August 17, 2019.

Accepted: August 18, 2019.

Available Online: August 24, 2019.

Declaration of interests: The authors declare no conflict of interest.

Funding: The authors confirm that the project has not funding or grants.



---

## INTRODUCTION

---

The Sahara, which covers about third of the land surface, encompasses a relatively sparse community of wild plants, 1200 species as compared to their surface (Benchelah et al., 2000). However, flora desert as well as medicinal plants have developed an import resistance strategy for unfavorable extreme conditions of their habitat such as high temperature, salinity, drought and high light intensities. In this stage, plants respond to environmental stress to withstand and to eliminate toxic reactive oxygen species (ROS) by developing ROS-detoxification mechanisms that can be divided into enzymatic and non-enzymatic systems (Trabelsi et al., 2010).

Furthermore, phenolic compounds are known noteworthy for their capacity of acquiring resistance to the environmental stress. These compounds exhibit an essential role as antioxidants and as a buffer of redox potential (Macheix et al., 2005; Oueslati et al., 2012; Falleh et al., 2012).

In recent time, focus on natural antioxidants increased all over the world to replace synthetic antioxidants because of their undesirable side effects on human health (Trabelsi et al., 2010).

In the other hand, the ethnobotanical knowledge of the Sahara populations has been used since immemorial time, which is an important tool to facilitate research on the sources of antioxidants. Besides, medicinal plants in desert area have higher antioxidant proprieties of the phenolic compounds because of their high redox ability (Trabelsi et al., 2010; Gasmi et al., 2019).

*Euphorbia retusa* Forssk. (synonym *E. cornuta* Pers.) is known as traditional remedy of infantile eczema, warts and trichiasis in the central Sahara of Algeria (Hammiche and Maiza, 2006). In Saudi Arabia *E. retusa* is used as local herbal medicine and as anti-asthmatic and anti-cough (Abdallah, 2015). It is an annual plant, which grows naturally up to 30 cm high in the Sahara (Quezel and Santa, 1962). Likewise, the chemical constituents of Algerian *E. retusa* have been investigated only for terpenoids (Haba et al., 2009); even there are a few

data about the antioxidant activities as well as phenolic composition of this species of *E. retusa* organs. So, the aim of this study was to determine the antioxidant capacity of methanolic extracts of *E. retusa* stems, leaves and seeds followed by identification of phenolics compounds in seeds extract using HPLC-DAD in order to improve the knowledge on this plant, to select the organ, which has a highest antioxidant capacity and to provide scientific support for its possible future development in the medicinal and pharmaceutical fields.

---

## MATERIAL AND METHODS

---

### Chemicals

Methanol, quercetin (Q), Folin-Ciocalteu's reagent (FCR), gallic acid, potassium acetate, aluminum nitrate, potassium persulfate, copper (II) chloride, sodium carbonate, potassium ferricyanide, phosphate buffer, trichloroacetic acid (TCA), ferric chloride, neocuproine, ammonium acetate, butylated hydroxyl anisole (BHA), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), ascorbic acid, 2,2'-azino-bis(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt (ABTS), were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

### Plant material

*E. retusa* was collected in June 2016 from Biskra region (north-east of Algeria: 34.896000, 5.756000). Plant identification was confirmed by researcher Rabia Sahki-Boutammime, National Forest Research Institute of Algeria. A voucher specimen was kept in the herbarium of the Laboratory of Biosystematic, Scientific and Technical Research Center for Arid Areas (CRSTRA), Biskra, Algeria. After harvesting, different parts of the plant (stems, leaves and seeds) were separated, cleaned and dried under shade at room temperature for seven days. After drying, the samples were prepared as a powder by blending each part of organs.

### Soxhlet extraction

Twenty grams (20 g) of powder of each part (stem, leaf and seed) were placed in a Soxhlet

apparatus. Extraction was performed with 200 mL of methanol for 8 hours. After that, the solvent was evaporated under pressure in a rotary evaporator (R215, BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) at 50°C to give a solid dry extract (DE).

## Bioactive compounds

### Total phenolic content

The total phenolic content in methanolic extracts was determined by using Folin-Ciocalteu according to the method of Singleton and Rossi (1965) with slight modification. The protocol was based on mixing 20 µL sample with 100 µL Folin-Ciocalteu reagent and 75 µL (7.5%) sodium carbonate. Absorbance was measured at 740 nm in the microplate reader after 2 h incubation in darkness at room temperature by using a 96-well microplate reader (Perkin Elmer, Enspire) (Amrani et al., 2019). The absorbance was measured at 765 nm by using a 96-well microplate multimode plate reader (EnSpire, PerkinElmer, MA, USA). The experiment was done in triplicate and the total phenolic compounds were expressed as gallic acid equivalents/mg DE (µg GAE/mg DE). Calibration equation for total phenol determination was found as  $y = 0.002x + 0.010$  ( $r^2 = 0.989$ ).

### Total flavonoid content

Total flavonoids were determined according to Türkoğlu et al. (2007) with slight modification. The method is based on the complexation with aluminium ( $Al^{3+}$ ). A 50 µL of the diluted extract solution was mixed with 1900 µL of methanol, 50 µL of 1 M potassium acetate and 50 µL of 10% aluminum nitrate. Then, the obtained mixture was distributed in the wells of 96-well microtiter plates in triplicate (200 µL for each extract mixture). After incubation at room temperature in dark for 40 min, the absorbance was measured at 415 nm by using a 96-well microplate reader (EnSpire, PerkinElmer, MA, USA). The experiment was done in triplicate and total flavonoid content was expressed as µg of quercetin equivalents per mg of dry extract (µg QE/mg DE) and calibration equation for the determination of total flavonoid contents was found as  $y = 0.0066x - 0.0063$  ( $r^2 = 0.998$ ).

### Phenolics identification by HPLC

The identification of phenolic compounds was done using an HPLC system consisting of a vacuum degasser, an autosampler, and a binary pump with a maximum pressure of 400 bar (Agilent 1260, Agilent Technologies, Germany) equipped with a reversed phase C18 analytical column of 4.6 x 100 mm and 3.5 µm particle size (Zorbax Eclipse XDB C18). The DAD detector was set to a scanning range of 200 - 400 nm. Column temperature was maintained at 25°C. A solvent system with a gradient of solvent A (methanol) and solvent B (1% formic acid) was used. Seed methanolic extracts were hydrolyzed according to the slightly modified method of Proestos et al. (2006). The flowrate of the mobile phase was 0.4 mL/min. The optimized gradient elution was performed as follows: 0-5 min, 10-20% A; 5-10 min, 20-30% A; 10-15 min, 30-50% A; 15-20 min, 50-70% A; 20-25 min, 70-90% A; 25-30 min, 90-50% A; 30-35 min, return to initial conditions. The peaks were monitored at 280 nm and were identified according to the retention time of calibration of 37 standards (Annex 1).

## Antioxidant capacity

### DPPH free radical-scavenging capacity

The free radical scavenging capacity of methanolic extracts was evaluated using DPPH assay as described by Blois (1958). About 40 µL of the each methanolic extract concentrations (6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 and 400 µg/mL) was added to 160 µL of a methanolic DPPH solution (6 mg DPPH dissolved in 100 mg methanol). The mixture was shaken vigorously and left standing at room temperature in the dark for 30 min. The experiment was done in triplicate and the absorbance was determined at 517 nm by using a 96-well microplate reader. Butylated hydroxy anisole (BHA) was used as a standard and the ability to scavenge the DPPH radical of each extract concentrations was calculated using the following equation [1]:

$$\text{DPPH scavenging effect (\%)} = [(A_0 - A_1 / A_0)] \times 100 \quad [1]$$

Where  $A_0$  was the absorbance of the negative control and  $A_1$  was the absorbance of the sample at 30 min.

#### *ABTS<sup>•+</sup> scavenging capacity*

ABTS radical-scavenging capacity of sample extracts was determined according to the method of Re et al. (1999). The ABTS<sup>•+</sup> was obtained by mixing 19.2 mg of 7 mM ABTS solution and 3.3 mg of 2.45 mM potassium persulfate solution, this emulsion was stored for 16 h at room temperature in the dark. Subsequently, the ABTS<sup>•+</sup> was diluted with ethanol to absorbance of 0.750 ( $\pm$  0.020) at 734 nm. Then, 160  $\mu$ L of ABTS<sup>•+</sup> solution was added to 40  $\mu$ L of sample solution in methanol at different concentrations (6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 and 400  $\mu$ g/mL) and these mixtures were homogenized. The experiment was done in triplicate and the absorbances were recorded at 734 nm by using a 96-well microplate reader. After 10 min, the inhibition percentage of each concentration was calculated relative to a blank absorbance (methanol) following the equation [1]. BHA was used as antioxidant standard for comparison of the activity.

#### *Cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC)*

The cupric reducing antioxidant capacity of methanolic extracts was determined according to the method of Apak et al. (2004). To an Eppendorf, 50  $\mu$ L each of 10 mM Cu (II), 50  $\mu$ L neocuproine of 7.5 mM, and 60  $\mu$ L ammonium acetate (1 M, pH 7.0) solutions were added. About 40  $\mu$ L of extracts at different concentrations (6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 and 400  $\mu$ g/mL) were transferred to the initial mixture. The experiment was done in triplicate and the obtained emulsion was distributed in the wells of 96-well microtiter plates. After 60 min, the absorbance of the emulsions was read at 450 nm by using a 96-well microplate reader. BHA was used as a positive control. Results were expressed as absorbance for each concentration against a reagent blank and  $A_{0.50}$  values ( $\mu$ g/mL) corresponding the concentration indicating 0.50 absorbance intensity.

#### *Reducing power*

The reducing power of the tested compounds was determined according to the method of Bouratoua et al. (2017). In order to determine the reducing power capacity, 10  $\mu$ L of serially diluted sample of each concentrations (1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 and 100  $\mu$ g/mL) were added into a 96 well round-bottomed plate. Following this, 40  $\mu$ L of 0.2 M phosphate buffer (pH 6.6) and 50  $\mu$ L of potassium ferricyanide (1%), were added to each well and the plate was incubated at 50°C for 20 min. Finally, 50  $\mu$ L of tricarboxylic acid (10%), distilled water (40  $\mu$ L) and 10  $\mu$ L of ferric chloride (0.1%) were added into each well in order to measure the reducing power capacity. Ascorbic acid was used as an antioxidant standard. The experiments were done in triplicate and the absorbance was measured in a microplate reader at 700 nm. Results were expressed as absorbance for each concentration against a reagent blank and  $A_{0.50}$  values ( $\mu$ g/mL) corresponding the concentration indicating 0.50 absorbance intensity.

#### **Statistical analysis**

Results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation of three replicates using the STATISTICA program. Analysis of one-way variance (ANOVA) was performed and significant differences among means were compared by Newman-Keuls Multiple Range test ( $p < 0.05$ ).

---

## **RESULTS**

---

### **Bioactive compounds**

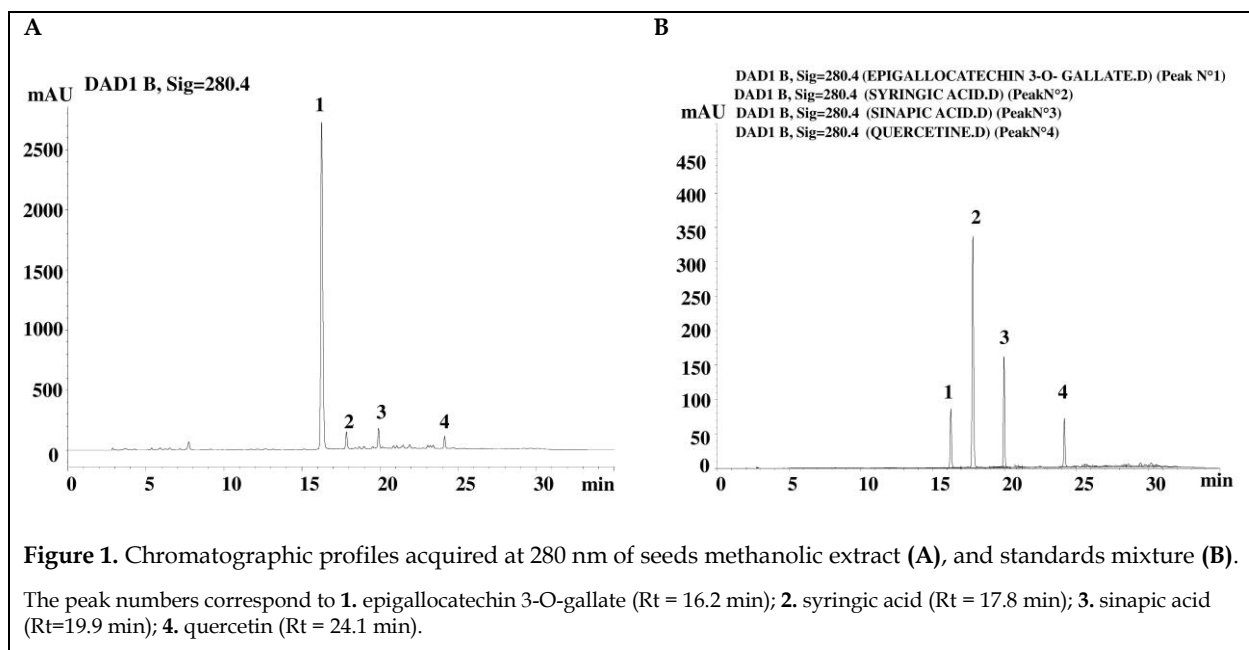
#### *Total phenolic and flavonoid contents*

Methanolic seed extracts had more phenolic content as compared to stem and leaf extracts. (Table 1). Also, the flavonoid contents in the three organs ranged from 91.83  $\pm$  8.18 to 14.06  $\pm$  5.64 ( $\mu$ g QE/mg DE). It was higher in seeds extract. Then, flavonoids represented 29.11% of total polyphenol content in seeds and it almost similar rate in stems and leaves (16.67% and 17.86%, respectively).

**Table 1.** Total phenolic and flavonoid contents of the methanolic extracts of *E. retusa*.

Extracts	Total phenolic ( $\mu\text{g GAE/mg DE}$ )	Total flavonoid ( $\mu\text{g QE/mg DE}$ )
Stems	$87.75 \pm 9.44^b$	$15.67 \pm 3.79^b$
Leaves	$84.33 \pm 6.66^c$	$14.06 \pm 5.64^b$
Seeds	$315.50 \pm 1.41^a$	$91.83 \pm 8.18^a$

Values expressed as mean  $\pm$  SD (n=3). In the same column followed by a different letter (a-c) are significantly different ( $p < 0.05$ ).  $\mu\text{g GAE/mg DE}$ : microgram gallic acid equivalent per milligram of dry plant extract.  $\mu\text{g QE/mg DE}$ : microgram quercetin equivalent per milligram of dry plant extract.



### Phenolics identification in *E. retusa* seeds by HPLC

Due to the highest antioxidant capacity and high concentration of phenolic compounds of *E. retusa* seeds, their crude extracts were retained for HPLC analysis (Fig. 1). The chromatogram of seeds extract was compared to authentic 37 standards of phenolic acids and flavonoids. Profiles composed by four identified phenolic compounds: epigallocatechin 3-O-gallate, syringic, sinapic acid and quercetin (Fig. 1A). These compounds have been identified according to their retention time and the spectral characteristics of their peaks compared to those of standards in Fig. 1B. Moreover, chromatogram shows that epigallocatechin 3-O-gallate was the major flavonoid compound in the seed extracts.

### Antioxidant capacity

DPPH free radical scavenging capacity of stem, leaf and seed methanolic extracts is shown in Table 2. DPPH scavenging ability increased with an increase in concentration of extracts between 6.25 and 100  $\mu\text{g/mL}$  and the inhibition percentage of DPPH radical in seed extracts was higher compared with BHA, stem and leaves. Similarly, low  $IC_{50}$  value represents a high potency and seed extracts had the highest DPPH radical scavenging capacity.

The experimental data of ABTS scavenging reduction (Table 3) indicated that the inhibition percentage of seed extracts was more than 60% at 6.25  $\mu\text{g/mL}$  as well as BHA. Therefore, stem extracts

exhibited higher capacity to scavenging the ABTS<sup>•+</sup> radical than leaf extracts between 25 and 400 µg/mL.

The results of CUPRAC test (Table 4) showed that seeds had a higher capacity than stem and leaf extracts. However, none of the extracts exhibited higher activity than standards BHA. Moreover, stem extracts exhibited higher capacity than leaf extracts.

Concerning reducing power capacity (Table 5), the absorbance of the extracts as well as the standard BHA increased with increasing of concentrations. The higher absorbance of the reaction mixture indicated a higher activity. Seed methanolic extracts had very high reducing power at all concentrations compared with stems and leaves extracts. Then, seeds extract indicates a low A<sub>0.50</sub> value as compared with ascorbic acid.

**Table 2.** Antioxidant capacity of the methanolic extracts of *E. retusa* by the DPPH scavenging assay.

Concentration (µg/mL)	Inhibition (%)			
	Stems	Leaves	Seeds	BHA
6.25	0.99 ± 1.16	-	44.63 ± 1.25	36.46 ± 2.45
12.5	4.08 ± 0.74	-	80.10 ± 2.37	59.63 ± 1.50
25	5.29 ± 1.96	0.56 ± 2.93	83.84 ± 1.03	78.91 ± 0.77
50	12.72 ± 0.20	9.20 ± 2.04	84.43 ± 1.09	83.11 ± 0.46
100	25.39 ± 0.41	21.37 ± 2.77	85.62 ± 0.10	84.21 ± 0.50
200	46.12 ± 0.54	37.83 ± 0.81	-	85.31 ± 0.35
400	76.19 ± 0.81	65.67 ± 0.18	-	-
IC <sub>50</sub> (µg/mL)	<b>225.87 ± 3.88<sup>c</sup></b>	<b>287.52 ± 2.92<sup>b</sup></b>	<b>7.20 ± 0.25<sup>a</sup></b>	<b>10.03 ± 0.84<sup>a</sup></b>

Values expressed as mean ± SD (n=3). In the last line followed by a different letter (a-c) are significantly different (p<0.05). BHA: butylated hydroxyl anisole. IC<sub>50</sub>: half maximal inhibitory concentration expressed as the necessary concentration to decrease the initial absorbance of DPPH by 50%.

**Table 3.** Antioxidant capacity of the methanolic extracts of *E. retusa* by the ABTS assay.

Concentration (µg/mL)	Inhibition (%)			
	Stems	Leaves	Seeds	BHA
6.25	8.60 ± 3.51	11.83 ± 1.33	65.23 ± 0.48	93.50 ± 0.09
12.5	11.55 ± 0.54	13.20 ± 2.06	91.09 ± 2.16	93.55 ± 0.09
25	24.88 ± 0.77	16.22 ± 1.10	91.80 ± 2.76	93.60 ± 0.16
50	29.21 ± 3.51	27.03 ± 0.66	92.68 ± 0.38	93.60 ± 0.95
100	54.44 ± 0.19	44.33 ± 1.32	93.07 ± 1.29	94.17 ± 0.90
200	70.11 ± 2.08	64.86 ± 0.25	-	-
400	90.05 ± 2.27	84.90 ± 2.86	-	-
IC <sub>50</sub> (µg/mL)	<b>91.45 ± 1.33<sup>b</sup></b>	<b>126.75 ± 3.83<sup>c</sup></b>	<b>&lt;6.25<sup>a</sup></b>	<b>&lt;6.25<sup>a</sup></b>

Values expressed as mean ± SD (n=3). In the last line followed by a different letter (a-c) are significantly different (p<0.05). BHA: butylated hydroxyl anisole. IC<sub>50</sub>: half maximal inhibitory concentration declared as the necessary concentration to decrease the initial absorbance of ABTS by 50%.

**Table 4.** Antioxidant capacity of the methanolic extracts of *E. retusa* by the CUPRAC assay.

Concentrations ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbance			
	Stems	Leaves	Seeds	BHA
6.25	0.09 $\pm$ 0.00	0.09 $\pm$ 0.00	0.36 $\pm$ 0.01	1.90 $\pm$ 0.04
12.5	0.11 $\pm$ 0.00	0.11 $\pm$ 0.02	0.59 $\pm$ 0.03	2.48 $\pm$ 0.18
25	0.12 $\pm$ 0.05	0.14 $\pm$ 0.00	0.84 $\pm$ 0.14	2.55 $\pm$ 0.20
50	0.21 $\pm$ 0.00	0.20 $\pm$ 0.00	1.29 $\pm$ 0.18	2.76 $\pm$ 0.11
100	0.33 $\pm$ 0.01	0.33 $\pm$ 0.01	1.31 $\pm$ 0.13	-
200	0.56 $\pm$ 0.01	0.54 $\pm$ 0.00	1.75 $\pm$ 0.24	-
400	0.98 $\pm$ 0.01	0.95 $\pm$ 0.12	2.72 $\pm$ 0.09	-
<b>A<sub>0.50</sub> (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>173.35 <math>\pm</math> 1.21<sup>c</sup></b>	<b>180.34 <math>\pm</math> 0.20<sup>d</sup></b>	<b>10.64 <math>\pm</math> 0.99<sup>b</sup></b>	<b>&lt;6.25<sup>a</sup></b>

Values expressed as mean  $\pm$  SD (n=3). In the last line followed by a different letter (a-d) are significantly different (p<0.05). BHA: butylated hydroxyl anisole. A<sub>0.50</sub>: A0.5 (mg/mL) corresponding the concentration indicating 0.50 absorbance intensity.

**Table 5.** Antioxidant capacity of the methanolic extracts of *E. retusa* by the reducing power assay.

Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbance			
	Stems	Leaves	Seeds	Ascorbic acid
1.5625	-	0.06 $\pm$ 0.01	0.19 $\pm$ 0.01	0.23 $\pm$ 0.01
3.125	0.07 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.01	0.20 $\pm$ 0.13	0.39 $\pm$ 0.01
6.25	0.08 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.17	0.36 $\pm$ 0.02	0.70 $\pm$ 0.08
12.5	0.11 $\pm$ 0.00	0.09 $\pm$ 0.01	0.53 $\pm$ 0.04	0.94 $\pm$ 0.05
25	0.15 $\pm$ 0.02	0.10 $\pm$ 0.06	0.76 $\pm$ 0.12	1.19 $\pm$ 0.40
50	0.24 $\pm$ 0.01	0.20 $\pm$ 0.03	1.00 $\pm$ 0.06	1.35 $\pm$ 0.18
100	0.37 $\pm$ 0.03	0.28 $\pm$ 0.06	1.13 $\pm$ 0.14	1.49 $\pm$ 0.03
<b>A<sub>0.50</sub> (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>&gt;100<sup>c</sup></b>	<b>&gt;100<sup>c</sup></b>	<b>11.84 <math>\pm</math> 1.72<sup>b</sup></b>	<b>4.40 <math>\pm</math> 0.39<sup>a</sup></b>

Values expressed as mean  $\pm$  SD (n=3). In the last line followed by a different letter (a-c) are significantly different (p<0.05). A<sub>0.5</sub> (mg/mL) corresponding the concentration indicating 0.50 absorbance intensity.

## DISCUSSION

### Total bioactive compounds

The phenolic compounds have been intensively investigated due to their antioxidant roles (Shaikh et al., 2015). However, the results of the present study suggest that the phenolic contents were found to be significantly variable between the three organs. These results support the findings indicating that the distribution of secondary metabolites may change depending on plant organ

(Karoune et al., 2015). Moreover, seed extracts registered the highest yield. In the same way Joshi et al. (2015) found the highest contents in total phenolic contents in seeds than flowers and leaves of *Cassia auriculata* (Linn.) methanolic extracts.

Likewise to the phenolic contents, *E. retusa* seeds were richer in total flavonoid contents than stems and leaves. Similar results were found by Falleh et al. (2008) hence indicating a notably higher flavonoid contents in *Cynara cardunculus* L. seeds than leaves and flowers.



Several reports have described the use of HPLC-DAD for the characterization of phenolic composition (Ksouri et al., 2009; Falleh et al., 2012; Karoune et al., 2015). For that, in this study was used the HPLC-DAD system to identify phenolic compounds including the major compound as the flavonoid epigallocatechin 3-O-gallate. However, the four phenolic compounds identified are known for the antioxidant capacity (Marinova and Yanishlieva, 2003; Zhang et al., 2012). In comparison to other works on phenolic compounds identified in same genus, luteolin-7-O-glucoside was the predominant flavonoid glycoside in the methanolic extract of aerial parts of *Euphorbia hirta* (Pióro-Jabrucka et al., 2011).

### Antioxidant capacity

The chemical complexity of extract and the multifaceted aspects of antioxidant reactivity such as a mechanism of electron/hydrogen donation (Tel et al., 2010) imply to use several methods for demonstrating antioxidant capacity. In fact, in the present study, mainly four methods were used to evaluate the antioxidant capacity of the methanolic extracts of *E. retusa* organs.

Practically, for DPPH test, the lowest IC<sub>50</sub> value indicated the highest antioxidant activity. IC<sub>50</sub> values of DPPH and percent inhibition at all concentrations were largely differed between the three organs. This trend is supported by previous studies (Ashraf et al., 2015; Moualek et al., 2016). Seeds showed higher antioxidant capacity without statistical differences ( $p > 0.05$ ) respect to the standard BHA and the IC<sub>50</sub> value of this extract (7.20 µg/mL) was three fold higher as compared to those reported by Falleh et al. (2008) for methanolic extract of seeds of *Cynara cardunculus* L. (IC<sub>50</sub> = 23 µg/mL). This Result suggests that, the seeds extract contains phytochemical constituents that are capable of donating hydrogen to a free radical to diminish the potential damage.

The ABTS radical cation is generated by the oxidation of ABTS with potassium persulfate (Saeed et al., 2012). As shown for DPPH scavenging (Table 2), the result indicates the higher capacity of seed extracts to quench ABTS<sup>•+</sup> and the half max-

imal inhibitory concentration of this extract was lower than 6.25 µg/mL as well as the BHA (Table 3). However, stem (91.4 µg/mL) and leave (126.7 µg/mL) extracts were characterized by higher capacity than other data reported by Saeed et al. (2012) for the methanol extract of aerial parts of *Torilis leptophylla* L. (IC<sub>50</sub> = 179 ± 3 µg/mL).

For the CUPRAC assay the reducing ability of the three organs and the BHA increased with the increase in concentrations between 6.25 and 400 mg/mL. A similar result was reported by Tel et al. (2010) between 50 and 800 µg/mL for *Salvia chinantha* hexane extract for this test. The seed extracts exhibited higher activities at all concentrations and the BHA (Table 4).

In reducing power assay, an increase in absorbance indicates a greater capacity of the extract reducing abilities and stronger antioxidant potential. The methanolic seeds extract was found to be the highest reducer. In the literature reviewed no studies were found on the reducing power of *E. retusa* organs.

As expected, a positive correlation level demonstrated between the phenolic compounds and the antioxidant activities for the four tests. This significant correlation was supported by Oueslati et al. (2012) analyzing *Sueda* species. However, total phenolic and flavonoid contents were higher in seeds followed by stems and leaves. This order has been approved by the antioxidant capacity of all methods tested. These results are corroborated with previous reports on *Tamarix gallica* L. flowers and leaves (Ksouri et al., 2009), concluding that leaves exhibited the lowest phenolic contents and antioxidant activity

---

### CONCLUSIONS

---

The results revealed that methanolic extracts of stems, leaves and seeds of *E. retusa* showed significant phenolic contents and antioxidant capacity with higher significant values for seed extracts. These results may confirm the interesting potential of *E. retusa* as a valuable natural alternative source to the synthetic antioxidants. More studies should be done to demonstrate the antioxidant activity of the seeds of this species as well as possible phar-

macological activity in diseases that pass through an oxidative stress component.

---

## CONFLICT OF INTEREST

---

The authors declare no conflict of interest.

---

## ACKNOWLEDGMENTS

---

This work was supported by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research. The authors declare that the present research study was performed without any funding from any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

---

## REFERENCES

---

- Abdallah EM (2015) Antimicrobial properties and phytochemical constituents of the methanol extracts of *Euphorbia retusa* Forssk. and *Euphorbia terracina* L. from Saudi Arabia. *South Asian J Exp Biol* 4(2): 48–53.
- Amrani A, Mecheri A, Bensouici C, Boubekri N, Benaissa O, Zama D, Benayache F, Benayache S (2019) Evaluation of antidiabetic, dermatoprotective, neuroprotective and antioxidant activities of *Chrysanthemum fontanesii* flowers and leaves extracts. *Biocatal Agric Biotechnol* 20: 101209.
- Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir SE (2004) Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J Agric Food Chem* 52(26): 7970–7981.
- Ashraf A, Sarfraz RA, Rashid MA, Shahid M (2015) Antioxidant, antimicrobial, antitumor, and cytotoxic activities of an important medicinal plant (*Euphorbia royleana*) from Pakistan. *J Food Drug Anal* 23(1): 109–115.
- Benchelah AC, Bouziane H, Maka M, Ouahes C (2000) *Fleurs du Sahara: Voyage Ethnobotanique Avec les Touaregs du Tassili*. Paris: Ibis Press.
- Blois MS (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181(18): 1119–1200.
- Bouratoua A, Khalfallah A, Bensouici C, Kabouche Z, Alabdul Magid A, Harakat D, Voutquenne-Nazabadioko L, Kabouche A (2017) Chemical composition and antioxidant activity of aerial parts of *Ferula longipes* Coss. ex Bonnier and Maury. *Nat Prod Res* 32(16): 1873–1880.
- Falleh H, Jalleli I, Ksouri R, Boulaaba M, Guyot S, Magné C, Abdelly C (2012) Plant physiology and biochemistry effect of salt treatment on phenolic compounds and antioxidant activity of two *Mesembryanthemum edule* provenances. *Plant Physiol Biochem* 52: 1–8.
- Falleh H, Ksouri R, Chaieb K, Karray-Bouraoui N, Trabelsi N, Boulaaba M, Abdelly C (2008) Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C R Biol* 331(5): 372–379.
- Gasmi A, Benabderrahim MA, Guasmi F, Elfalleh W, Triki T, Zammouri T, Ferchichi A (2019) Phenolic profiling, sugar composition and antioxidant capacity of arta (*Calligonum comosum* L.), a wild Tunisian desert plant. *Ind Crop Prod* 130: 436–442.
- Haba H, Lavaud C, Magid AA, Benkhaled M (2009) Diterpenoids and triterpenoids from *Euphorbia retusa*. *J Nat Prod* 72(7): 1258–1264.
- Hammiche V, Maiza K (2006) Traditional medicine in Central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *J Ethnopharmacol* 105(3): 358–367.
- Joshi PA, Pilley HH, Wadegaonkar VP, Wadegaonkar PA (2015) Comparative assessment of antioxidant potential of *Cassia auriculata* (Linn.) flower, leaf and seed methanolic extracts. *Int J Pharm Pharm Sci* 7(9): 381–385.
- Karoune S, Falleh H, Kechebar MSA, Halis Y, Mkadmini K, Belhamra M, Rahmoune C, Ksouri R (2015) Evaluation of antioxidant activities of the edible and medicinal *Acacia albida* organs related to phenolic compounds. *Nat Prod Res* 29(5): 452–454.
- Ksouri R, Falleh H, Megdiche W, Trabelsi, Mhamdi N, Chaieb K, Bakrouf A, Magné C, Abdelly C (2009) Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. *Food Chem Toxicol* 47(8): 2083–2091.
- Macheix JJ, Fleuriet A, Jay-Allemand C (2005). *Les Composés Phénoliques Des Végétaux: Un Exemple de Métabolites Secondaires D'Importance Économique*. Lausanne: Press Polytechniques et Universitaires Romandes, pp. 192.
- Marinova EM, Yanishlieva NV (2003) Antioxidant activity and mechanism of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures. *Food Chem* 81(2): 189–197.
- Moualek I, Aiche GI, Guechaoui NM, Lahcene S, Houali K (2016) Antioxidant and antiinflammatory, activities of *Arbutus unedo* aqueous extract. *Asian Pac J Trop Biomed* 6(11): 937–944.
- Oueslati S, Trabelsi N, Boulaaba M, Legault J, Abdelly C, Ksouri R (2012) Evaluation of antioxidant activities of the edible and medicinal *Suaeda* species and related phenolic compounds. *Ind Crop Prod* 36(1): 513–518.
- Pióro-Jabrucka E, Pawełczak A, Przybył JL, Bączek K, Węglarz Z (2011) Accumulation of phenolic and sterol compounds in *Euphorbia hirta* L. *Herba Pol* 57(2): 30–37.
- Proestos C, Boziaris IS, Nychas GJE, Komaitis M (2006) Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chem* 95(4): 664–671.
- Quezel P, Santa S (1962) *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Paris: Éditions du Centre National de la Recherche Scientifique. T1 ET.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an

- improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26(9-10): 1231–1237.
- Saeed N, Khan MR, Shabbir M (2012) Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *BMC Complement Altern Med* 12: 221.
- Shaikh RU, Pund MM, Gacche RN (2015) Evaluation of anti-inflammatory activity of selected medicinal plants used in Indian traditional medication system *in vitro* as well as *in vivo*. *J Tradit Complement Med* 6(4): 355–361.
- Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. *Am J Enol Viticult* 16: 144–158.
- Tel G, Öztürk M, Duru ME, Harmandar M, Topçu G (2010) Chemical composition of the essential oil and hexane extract of *Salvia chionantha* and their antioxidant and anticholinesterase activities. *Food Chem Toxicol* 48(11): 3189–3193.
- Trabelsi N, Megdiche W, Ksouri R, Falleh H, Oueslati S, Bourgou S, Hajlaoui H, Abdely C (2010) Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *LWT - Food Sci Technol* 43(4): 632–639.
- Türkoğlu A, Duru ME, Mercan N (2007) Antioxidant and antimicrobial activity of *Russula delica* Fr: An edible wild mushroom. *Eurasian J Anal Chem* 2(1): 54–67.
- Zhang HM, Wang CF, Shen SM, Wang GL, Liu P, Liu ZM, Liu ZM, Wang YY, Du SS, Liu ZL, Wei Z (2012) Antioxidant phenolic compounds from Pu-erh tea. *Molecules* 17(12): 14037–14045.

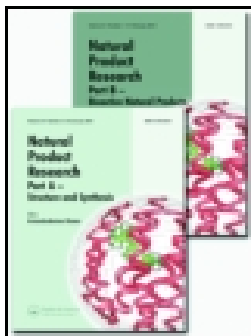
**AUTHOR CONTRIBUTION:**

Contribution	Lahmadi S	Belhamra M	Karoune S	Kechebar MSA	Bensouici C	Kashi I	Mizab W	Ksouri R
Concepts or ideas			x	x				
Design	x	x	x	x				x
Definition of intellectual content	x		x	x				
Literature search	x							
Experimental studies	x				x	x	x	
Data acquisition	x				x			
Data analysis	x			x	x			
Statistical analysis	x				x	x		
Manuscript preparation	x							
Manuscript editing	x							
Manuscript review	x	x	x	x	x	x	x	x

**Citation Format:** Lahmadi S, Belhamra M, Karoune S, Kechebar MSA, Bensouici C, Kashi I, Mizab W, Ksouri R (2019) *In vitro* antioxidant capacity of *Euphorbia retusa* Forssk. from Algerian desert. *J Pharm Pharmacogn Res* 7(5): 356–366.

**Annex 1.** Standard compounds used by HPLC-DAD analysis.

No.	Standard Compound	Retention time (min)
1	Ascorbic acid	4.414
2	Gallic acid	8.209
3	Resorcinol	10.308
4	Catechol	12.034
5	Catechin hydrate	14.307
6	Epigallocatechin	14.699
7	Chlorogenic acid	15.752
8	Epicatechin 3-O gallate	16.267
9	Caffeic acid	17.424
10	Syringic acid	17.802
11	p-Coumaric acid	19.692
12	Sinapic acid	19.977
13	Ferulic acid	20.230
14	Myricitrin	20.741
15	Luteolin 7-O glucoside	20.937
16	Trans hydroxycinnamic acid	20.942
17	Coumarin	20.995
18	Isorhamnetin 3-O glucoside	21.100
19	Resveratrol	21.737
20	Rosmarinic acid	21.753
21	Protocatechuic acid ethyl ether	21.773
22	Oleuropein	21.909
23	Isoquercitrin	21.925
24	Ellagic acid	22.278
25	Myricetin	22.457
26	Kaempferol 3-O rutinoside	22.538
27	Isorhamnetin 3-O rutinoside	22.833
28	Quercetin	24.171
29	Naringenin	24.320
30	Trans cinnamic acid	24.360
31	Laricitrin	24.749
32	Luteolin	24.787
33	Kaempferol	25.455
34	Isorhamnetin	25.762
35	Amentoflavone	26.873
36	Apigenin	25.897
37	Cirsimaritin	26.948



# Natural Product Research

Formerly Natural Product Letters

ISSN: 1478-6419 (Print) 1478-6427 (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/gnpl20>


## Phenolic constituents and antioxidant activity of *Euphorbia retusa* Forssk

Selwa Lahmadi, Mohamed Belhamra, Samira Karoune, Kashi Imad, Chawki Bensouici, Mohamed Seif Allah Kechebar, Youcef Halis & Riadh Ksouri

To cite this article: Selwa Lahmadi, Mohamed Belhamra, Samira Karoune, Kashi Imad, Chawki Bensouici, Mohamed Seif Allah Kechebar, Youcef Halis & Riadh Ksouri (2019): Phenolic constituents and antioxidant activity of *Euphorbia retusa* Forssk, Natural Product Research, DOI: [10.1080/14786419.2019.1582040](https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1582040)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1582040>

 View supplementary material 

 Published online: 05 Mar 2019.

 Submit your article to this journal 

 View Crossmark data 



## Phenolic constituents and antioxidant activity of *Euphorbia retusa* Forssk

Selwa Lahmadi<sup>a,b</sup>, Mohamed Belhamra<sup>a</sup>, Samira Karoune<sup>b</sup>, Kashi Imad<sup>c</sup>, Chawki Bensouici<sup>c</sup>, Mohamed Seif Allah Kechebar<sup>b</sup>, Youcef Halis<sup>b</sup> and Riadh Ksouri<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire de Diversité des Écosystèmes et Dynamiques des Systèmes de Production Agricoles en Zones Arides, Dépt d'agronomie, Université Mohamed Khider, Biskra, Algeria; <sup>b</sup>Centre de Recherche Scientifique et Technique sur les Régions Arides, Campus Universitaire, Biskra, Algeria; <sup>c</sup>Centre de Recherche en Biotechnologie, Constantine, Algeria; <sup>d</sup>Laboratoire des Plantes aromatiques et médicinales, Centre de Biotechnologie de Borj-Cédria, Hammam-lif, Tunisia

### ABSTRACT

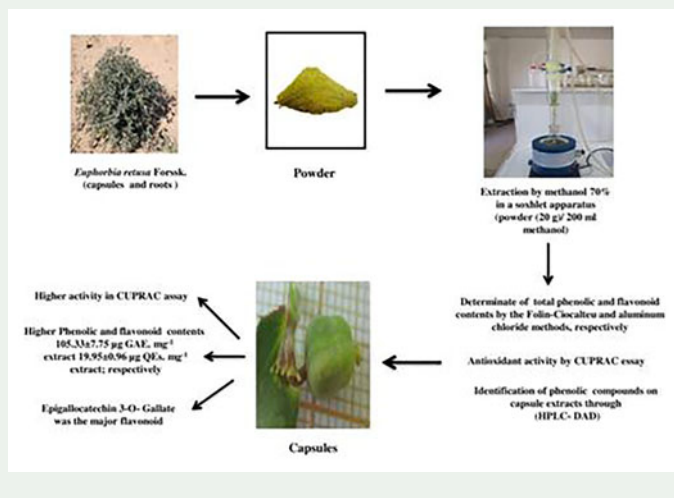
The aim of the present study was to evaluate the phenolic contents in capsule and root methanolic extracts of *Euphorbia retusa* followed by identification of phenolic on capsule extracts through high-performance liquid chromatography (HPLC- DAD) for the first time. Likewise, the antioxidant activity of both extracts was investigated by using Cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC). The result implies that *E. retusa* capsules have the highest phenolic and flavonoid contents with  $105.33 \pm 7.75 \mu\text{g GAE} \cdot \text{mg}^{-1}$  extract  $19.95 \pm 0.96 \mu\text{g QEs} \cdot \text{mg}^{-1}$  extract; respectively and the highest activity in CUPRAC assay with epigallocatechin 3-O-Gallate was the major flavonoid. Thus, our findings indicate that *E. restusa* capsules may be valorized in industrial fields.

### ARTICLE HISTORY

Received 7 January 2019  
Accepted 10 February 2019

### KEYWORDS

*Euphorbia retusa*; CUPRAC; HPLC-DAD; extracts



## 1. Introduction

Recently, an increasing demand for natural antioxidants to replace synthetic antioxidants that cause various health risks (Ksouri et al. 2009). However, the antioxidative activity is may be related to the level of phenolic compounds of species (Trabels et al. 2012). Similarly, phenolic compound are known for their ability to scavenging reactive oxygen species (ROS) toxic because of their high redox potentials such as reducing agents of copper (II) (Tel et al. 2012). Thus, in this study we examined phenolic compounds and antioxidant activity using Cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method of methanolic extracts of roots and capsules of *Euphorbia retusa* Forssk. from the northern algerian Sahara. However, *Euphorbia* species are known for their traditional medicine uses (Frezza et al. 2018), for that we choose *Euphorbia retusa* in this study in order to valorise this plant in pharmaceutical field.

## 2. Results and discussion

The total phenolic and the flavonoid contents of *E. retusa* capsule and root methanolic extracts was determined as well as measured of the antioxidant activity by Cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method. Results showed a significant difference between both organs for their phenolic compounds and their antioxidant activity. Similar trends were found by Karoune et al. (2015) for the phenolic compounds and the antioxidant activity of different organs of *Acacia albida*. As expected, this variability is closely linked to the endogenous and exogenous factors (Oueslati et al. 2012). Practically, capsule extracts exhibiting a much higher phenolic and flavonoid contents ( $105.33 \pm 7.75 \mu\text{g GAE} \cdot \text{mg}^{-1}$  extract and  $19.95 \pm 0.96 \mu\text{g QEs} \cdot \text{mg}^{-1}$  extract, respectively) than root extracts ( $68.50 \pm 5.7 \pm 0.96 \mu\text{g GAE} \cdot \text{mg}^{-1}$  extract and  $1.63 \pm 0.25 \mu\text{g QEs} \cdot \text{mg}^{-1}$  extract, respectively) (Table S1). Moreover, the both organs of *E. retusa* contained much more phenolic contents as compared to methanolic extracts of aerial parts of the same species from Egypt studied by Ghareeb et al. (2018) ( $33.9 \pm 0.65 \mu\text{g GAE} \cdot \text{mg}^{-1}$  extract). Similarly to phenolic content, capsule extracts exhibited a high activity in CUPRAC essay competing with root extracts at all concentrations (Table S2). However, the positive control BHT was the most powerful at all concentrations. Thus, this capacity may be related to the higher polyphenol contents in capsule extracts as compared to root extracts. For that, we used the (HPLC - DAD) system to identify phenolic compounds in capsules. This analysis allowed the identification of five compounds; Catechine hydrate (1), Epigallocatechin 3-O- Gallate (2), Syringic acid (3), Sinapic acid (4) and Quercetine (5) (Figures S1, a and b). Additionally, Epigallocatechin 3-O- Gallate was found to be the major compound with epigallocatechin 3-O- Gallate as the major flavonoid. Indeed, this compound has very important biological activities as anti-inflammatory and antineoplastic effects (Filippi et al. 2017).

## 3. Conclusion

In conclusion, *E. retusa* capsule and root extracts exhibited differential phenolic compounds and antioxidant activity. In addition, capsules had the best phenolic contents and the best antioxidant activity in CUPRAC assay. From this organ, Epigallocatechin-

3-O-gallate was the major flavonoid identified which is important compound in treatment of a variety of diseases. Thus, it is worthwhile to consider the utilisation of this species in pharmaceutical industries.

### Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

### Funding

This work was supported by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research.

### References

- Filippi A, Picot T, Aanei CM, Nagy P, Szöllösi J, Campos L, Ganea C, Mocanu MM. 2017. Epigallocatechin-3-O-gallate alleviates the malignant phenotype in A-431 epidermoid and SKBR-3 breast cancer cell lines. *Int J Food Sci Nutr.* 1465–3478.
- Frezza C, Venditti A, Sciubba F, Tomai P, Antonetti M, Franceschin M, Di Cocco ME, Gentili A, Delfini M, Serafini M, et al. 2018. Phytochemical profile of *Euphorbia peplus* L. collected in Central Italy and NMR semi-quantitative analysis of the diterpenoid fraction. *J Pharma Biomed Anal.* 160:152–159.
- Karoune S, Falleh H, Kechebar MSA, Halis Y, Mkadmini K, Belhamra M, Rahmoune C, Ksouri R. 2015. Evaluation of antioxidant activities of the edible and medicinal *Acacia albida* organs related to phenolic compounds, *Nat Prod Res.* 29 (5):452–454.
- Ksouri R, Falleh H, Megdiche W, Trabelsi N, Hamdi B, Chaieb K, Bakhrouf A, Magné C, Abdelly C. 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L and related polyphenolic constituents. *Food Chem Toxicol.* 47, 2083–2091.
- Oueslati S, Trabelsi N, Boulaaba M, Legault J, Abdelly C, Ksouri R. 2012. Evaluation of antioxidant activities of the edible and medicinal *Suaeda* species and related phenolic compounds. *Ind Crops Prod.* 36:513–518.
- Ghareeb TA, El-Toumy SA, El – Gendy H, Haggag EG. 2018. Secondary metabolites and hepato-protective activity of *Euphorbia retusa*. *JAPR.* 2 (4): 283–291.
- Tel G, Apaydin M, Mehmet E, Duruet M. E, Öztürk M. 2012. Antioxidant and cholinesterase inhibition activities of three *Tricholoma* species with total phenolic and flavonoid contents: the edible Mushrooms from Anatolia. *Food Anal.* 5:495–504.
- Trabelsi N, Oueslati S, Falleh H, Waffo-Tégou P, Papastamoulis Y, Mérillon J.M, Abdelly C, Ksouri R. 2012. Isolation of powerful antioxidants from the medicinal halophyte *Limoniastrum guyonianum*. *Food Chem.* 135:1419–1424.



## Résumé

Ce travail contribue à la valorisation de deux plantes sahariennes d'intérêt médicinales (*Euphorbia granulata* Forssk et *Euphorbia retusa* Forssk) en les caractérisant par l'évaluation phytochimique des polyphénols et des flavonoïdes contenus dans la partie aérienne d'*E.granulata*, les racines, les tiges, les feuilles, les capsules et les graines d'*E. retusa* avec une évaluation de leur activité antioxydante. Ainsi et afin d'obtenir un maximum de composantes phénoliques, une extraction successive par le soxhlet a été effectuée en utilisant trois solvants de polarité croissante; acétate d'éthyle, méthanol et eau distillée. En plus, un facteur de protection solaire a été évalué seulement pour les extraits d'*E.retusa*. Aussi, les composés phénoliques des extraits méthanolique des graines, des capsules d'*E. retusa* et de la partie aérienne d'*E. granulata* sont identifiés par l'CLHP-DAD.

Les principaux résultats de l'étude phytochimique sur les extraits d'*E. granulata* montrent que l'extrait méthanolique qui a une teneur élevée en polyphénols présente une faible capacité réductrice de cuivre et de chélater les ions ferreux. Par ailleurs, Les résultats relatifs aux teneurs en composés phénoliques, aux activités antioxydantes et à l'activité photoprotective ont mis en évidence une importante variabilité entre les 15 extraits d'*E.retusa* où les extraits de graines se distinguent généralement par des valeurs importantes. En outre, la variation de la corrélation entre la teneur en polyphénols et la capacité antioxydante (positive et négative) au niveau des extraits de chaque plante indique que chaque activité est liée aux certaines composantes phénoliques.

Finalement, l'analyse par CLHP des composés phénoliques ont montré généralement que les composantes identifiés ont des propriétés antioxydantes.

Dans l'ensemble, nos résultats démontrent l'excellent potentiel d'*E.granulata* et d'*E.retusa* comme source de molécules bioactives à intérêts économiques et thérapeutiques divers.

**Mots clés :** *Euphorbia retusa*, *Euphorbia granulata*, Polyphénols, Activité antioxydante, FPS.

## **Abstract**

This work contributes to explore phenolic compounds and antioxidants activity of both Saharan medicinal plants extracts *Euphorbia granulata* Forssk. and *Euphorbia retusa* Forssk. In addition, photoprotective activity of *E.retusa* extracts was evaluated.

For that, in the soxhlet apparatus; *E. retusa* roots, stems, leaves, capsules, seeds and aerial parts of *E. granulata* were extracted separately and successively by ethyle acetate, methanol and distilled water. However, the phenolic compounds of areal parts of *E. granulata*, seeds and capsules of *E .retusa* were identified by CHLP-DAD.

The results of phenolic compounds and antioxidant activitie of *E. granulata* showed that methanolic extract which has higher phenolic contents give a low activity in CUPARC and metal chelating assays. Then, there is an important variability between *E. retusa* extracts concerning phenolic and flavonoid contents, antioxidant and phtoprotective activities where seeds extracts generally exhibit a higher values. Moreover, the correlation variability between phenolic compounds and antioxidant capacities in each plant extracts indicated that the antioxidant potential of each activity is closely linked to certain compounds.

Finally, HPLC analysis demonstrated generally that phenolic acid and flavonoid compound identified were characterized by theirs antioxidant activities. These results may confirm the interesting potential of *E.granulata* and *E.retusa* as a bioactive molecules source.

**Key words:** *Euphorbia granulata*, *Euphorbia retusa*, phenolic compounds, antioxidant activities, SPF.

## الملخص

يهدف العمل المقدم إلى تثمين نبتتين طبيبتين تنمون في صحراء الجزائر هما *Euphorbia granulata* و *Euphorbia retusa* Forsk Forsk وهذا من خلال التحليل الفيتوكيميائي لمحتوى المركبات الفينولية ونشاطها المضاد للأكسدة و كذا تحديد بعض المركبات الفينولية بواسطة التحليل الكروماتوغرافي لكلا النباتين, أما قيم عامل الحماية ضد أشعة الشمس فقد خصص فقط لمستخلصات *Euphorbia retusa*. تم استخلاص هذه المركبات من جذور, سيقان, أوراق, رامث و بذور *Euphorbia retusa* ضف إلى القسم الهوائي ل *Euphorbia granulata* علما أن المركبات الفينولية لكل جزء تم استخلاصه بواسطة ثلاث مذيبات وهي أسيتات الايثيل, الميثانول و الماء المقطر وهذا باستعمال آلة السوكسلي.

نتائج التحليل الفيتوكيميائي لمستخلصات *Euphorbia granulata* بينت أن مستخلص الميثانول الذي يحتوي على أكبر كمية من الفينولات له نتائج أكسدة ضعيفة لنشاط ال CUPRAC و métal chélate مقارنة بالمستخلص المائي.

بالإضافة إلى ذلك فإن هناك اختلاف كبير في محتوى الفينولات و الفلافونيدات , النشاط المضاد للأكسدة و عامل الحماية ضد أشعة الشمس بين مختلف مستخلصات أجزاء نبات *Euphorbia retusa* أين تسود البذور عموما المرتبة الأولى في الأهمية.

الاختلاف في تقاعلا بين النشاط المضاد للأكسدة و و تحمالفينولات دنع مستخلصات لكتبتن يؤكد أن كل نشاط مضاد للأكسدة يتعلق بتركيبية معينة من الفينولات.

وفي الأخير فإن التحليل الكروماتوغرافي للمركبات الفينولية للمستخلص الميثانولي للقسم الهوائي ل *Euphorbia granulata*, لبذور, رامث *Euphorbia retusa* أثبت وجود مركبات تتميز بنشاطها ضد الأكسدة, وهذا ما يؤكد إمكانية استعمال هذين النباتين كمورد بيوجيوي فعال.

الكلمات المفتاحية: *Euphorbia granulata*, *Euphorbia retusa* المركبات الفينولية, النشاط المضاد

للاكسدة, FPS.