

N° Ref :.....

Centre Universitaire

Abdel Hafid Boussouf Mila

Institut des Sciences et de la Technologie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire préparé En vue de l'obtention du diplôme de Master

En : - Filière : Sciences Biologiques

-Spécialité : Biologie Appliquée et Environnement : Biochimie et microbiologie appliquée

Thème

**Etude de l'activité antioxydante des extraits d'une
plante médicinale du genre *Euphorbia* :
*Euphorbia helioscopia***

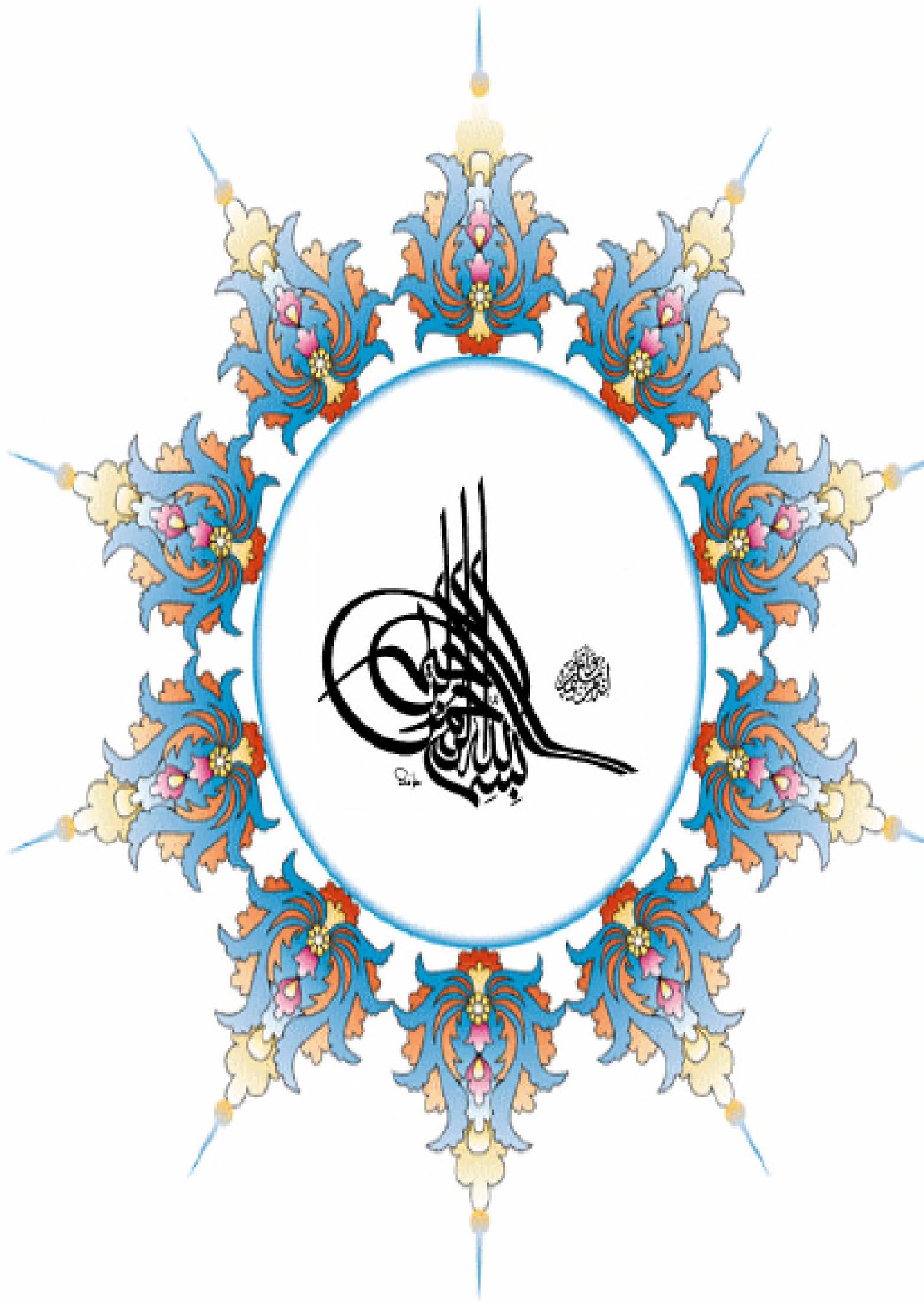
**Préparé par : BOULKOUR Sara
GUENDOUSA Samira**

Soutenu devant le jury :

- Président : M^r BOUNAMOUS Azzedine
- Examineur : M^r ZOUAGHI Mohammed
- Promoteur : M^{elle} GHOUT Agena

Grade : Maitre de conférence A
Grade : Maitre assistant A
Grade : Maitre assistante A

Année universitaire : 2014/2015





édicaces

*Je dédie ce travail, tout
d'abord à mes parents qui m'ont
soutenu tout au long de mes
études par leur dévouement et
abnégation*

A mes frères et sœurs

A toute ma famille.

A tous mes amis.

A tous mes Enseignants

Je leur souhaite une très longue vie

Sara et Samira

Remerciements

Avant tout, Nos remerciements Allah de s'avoir donné la volonté afin d'arriver à la finalité de ce modeste travail.

*Nous tenons à remercier également notre promotrice **M^{lle} GHOUT Agena**, Maitre assistante au centre universitaire de Mila, qui nous a suivi et guidé tout au long de ce travail et pour sa confiance et ses encouragements.*

*Nous remercions très vivement **Mr: BOUNAMOUS Azzedine** Maitre de Conférence au centre universitaire de Mila, pour l'honneur qu'il nous fait pour avoir accepté de présider le jury.*

*Mos vifs remerciements vont aussi à monsieur : **ZOUAGHI Mohammed**, Maitre assistant au centre universitaire de Mila, pour l'honneur qu'il nous fais d'avoir accepter d'examiner notre travail.*

*Nos remerciements à nos très chers parents, frères, soeurs, collègues et amis en particulière **Guerzou Abderrahmane**.*

*Nous adressons aussi nos remerciements à **Mr: DIF Guendouz** qui nous a encouragés, soutenu durant tout notre parcours pour ces conseils les plus importants, pour sa patience. Enfin nous remercions toutes personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'achèvement de ce travail. Merci bien.*

SARA et SAMIRA

Liste d'abréviation

CAT :	Catalase.
CHCl₃ :	Chloroforme.
°C :	Degré Celsius.
Fe Cl₃ :	Chlorure de fer (III).
Fe Cl₂ :	Chlorure de fer (II).
Fe⁺⁺ :	Fer ferreux.
Fe⁺⁺⁺ :	Fer ferrique.
GSH :	Glutathion.
GSSG :	Glutathion oxydé.
H₂O₂ :	Peroxyde d'hydrogène.
K₃ Fe (CN)₆ :	Ferricyanure de potassium.
Max :	Maximum.
Mn-SOD :	Superoxyde dismutase à manganèse.
NADPH :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.
Na₂CO₃ :	Carbonate de sodium.
NO :	Nitric oxide.
•OH :	Radical hydroxyle.
O₂⁻ :	Anion superoxyde.
O₂^{•-} :	Radical superoxyde.
pH :	Potentiel d'hydrogène.



ROS :	Reactive Oxygen Space (espèces réactives de l'oxygène).
SOD :	Superoxyde dismutase.
Se-GPx :	Séloenzyme glutathion peroxydase.
UV :	Ultra-violet.



Liste des figures

Figure n°	Titres	Page
01	Photo d'une espèce du genre <i>Euphorbia</i> (Bayer <i>et al.</i> , 1998).	04
02	Biosynthèse des composés phénoliques les plus largement distribués par la voie du shikimate (Crozier <i>et al.</i> , 2006).	09
03	La structure de base des flavonoïdes (Di Carlo <i>et al.</i> , 1999).	11
04	La biosynthèse des flavonoïdes illustrant les voies de l'acétyl CoA et de la phénylalanine (Lhuillier, 2007).	13
05	Illustration des différentes réactions enzymatiques conduisant aux principales classes de flavonoïdes (Marfak, 2011).	14
06	Balance oxydants/ antioxydants en faveur d'un stress oxydatif (John <i>et Schneider</i> , 2003).	20
07	Les réactions catalysés par des antioxydants enzymatiques (Gaté <i>et al.</i> , 1999).	22
08	Structure de l'acide ascorbique (vitamine C) (Reginald, 2000).	23
09	Structure de la vitamine E (Vertuani <i>et al.</i> , 2004).	23
10	Oligoéléments nécessaires aux activités des enzymes antioxydantes (Roussel, 2009).	25
11	Les étapes du fractionnement de l'extrait brut de la partie aérienne de <i>Euphorbia helioscopia</i> .	27
12	Dosage des composés phénoliques (Singleton <i>et al.</i> , 1999).	29
13	Dosage des flavonoïdes (Djeridane <i>et al.</i> , 2006).	30
14	Mesure du pouvoir réducteur Oyaisu <i>et al</i> (1986) in Amoroweiz <i>et al</i> (2004).	31
15	Histogramme du rendement d'extraction.	32
16	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.	33
17	Courbe d'étalonnage de la quercétine.	34
18	Pouvoir réducteur des standards testés à différentes concentrations.	35
19	Pouvoir réducteur des trois extraits différents.	36



Liste des tableaux

Tableau n°	Titres	Page
I	Les principaux constituants chimiques des Euphorbiacées.	06
II	Structure du squelette des polyphénols.	10
III	Les principales classes de flavonoïdes.	15
IV	Tableau récapitulatif regroupant les rendements des différents extraits.	32
V	Appareils et instruments.	Annexes
VI	Les produits chimiques et les réactifs.	Annexes



Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction01

Chapitre I: Aperçu bibliographique sur le genre Euphorbia

I.1.Description du genre Euphorbia.....03

I.2.Classification botanique.....04

I.3.Origine et distribution géographique.....05

I.4.Utilisations traditionnelles du genre Euphorbia.....05

I.5.Composition chimique du genre Euphorbia.....06

I.6.La toxicité.....07

Chapitre II : Les substances bioactives du genre Euphorbia

II.1.Les polyphénols.....09

II.1.1.Définition.....09

II.1.2.Biosynthèse.....09

II.1.3.Classification des polyphénols.....10

II.1.4.Les activités biologiques des polyphénols.....11

II.2.Les flavonoïdes.....11

II.2.1.Définition.....11

II.2.2.Le rôle des flavonoïdes.....12

II.2.3.Biosynthèse des flavonoïdes.....12

II.2.4.Classifications.....15

II.2.5.Effets des flavonoïdes.....16

Chapitre III : Les Radicaux libres

III.1.Définition.....18

III.2.Origine des radicaux libres.....18

III.3.Le stress oxydatif.....19

III.3.1.Définition.....19



III.3.2.Les antioxydants.....	20
III.3.2.1.Définition.....	20
III.3.2.2.Les antioxydants enzymatiques.....	20
III.3.2.3.Les antioxydants non enzymatiques.....	22

Chapitre IV : Matériels et Méthodes

IV.1.Matériels	26
IV.1.1.Matériel végétal utilisé.....	26
IV.1.2.Appareils et réactifs.....	26
IV.2.Méthodes	26
IV.2.1.Préparation de la poudre végétale.....	26
IV.2.2.Préparation de l'extrait brut des composés phénoliques.....	26
IV.2.3.Fractionnement de l'extrait brut.....	26
IV.2.4.Taux d'extraction des composés phénoliques et des fractions.....	28
IV.3.Dosage des substances bioactives.....	28
IV.3.1.Dosage des composés phénoliques.....	28
IV.3.2.Dosage des flavonoïdes.....	29
IV.4.Détermination de l'activité antioxydante.....	30
IV.4.1.Mesure du pouvoir réducteur.....	30

Chapitre V: Résultats et discussion

V.1.Taux d'extraction de l'extrait brut.....	32
V.2.Taux d'extraction des fractions.....	32
V.3.Dosage des composés phénoliques.....	33
V.3.1.Dosage des polyphénols totaux.....	33
V.3.2.Dosage des flavonoïdes.....	34
V.4.Etude de l'activité antioxydante.....	35
V.4.1.Mesure du pouvoir réducteur.....	35



Conclusion.....38

Annexe

Références Bibliographiques



Introduction

Introduction

Depuis longtemps, les plantes médicinales ont été employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines. En fait, leurs propriétés thérapeutiques sont dues à la présence de centaines, voire des milliers de substances actives à l'intérieur de leurs organes (feuilles, fleurs, racines,...) et parfois dans des cellules spécialisées de la plante. Ces remèdes naturels sont bien souvent très efficaces avec moins d'effets secondaires reconnus que beaucoup de médicaments de synthèse, mais peuvent néanmoins être mortels ou toxiques pour l'organisme lorsqu'ils sont mal utilisés (**Duraffourd et al., 1997**).

Aujourd'hui les plantes sont de plus en plus utilisées dans l'industrie pharmaceutique pour l'extraction des principes actifs afin de développer des médicaments plus efficaces. L'enquête ethnobotanique s'est avérée une des approches la plus fiable pour la découverte de nouveaux médicaments. Ainsi le maprouneacin (*Maprounea africana*) utilisé comme agent antidiabétique, le taxol (*Breviflora taxus*) utilisé comme drogue antitumorale, l'artémisinine (*Artemisia annua*) utilisé comme composé antipaludique efficace contre toutes les souches résistantes de *Plasmodium* ont été découvertes à partir de plantes et sont directement employés. Ces trois plantes, ainsi que beaucoup d'autres, sont largement utilisés en médecine traditionnelle (**Ajibesin et al., 2008**).

L'Algérie possède une flore végétale riche et diversifiée. Parmi les plantes médicinales qui constituent le couvert végétal, se trouve le genre *Euphorbia*, ce dernier est largement distribué surtout dans les régions méditerranéennes. De nombreuses espèces de ce genre sont utilisées en médecine traditionnelle parce qu'elles renferment plusieurs molécules douées d'activités thérapeutiques, parmi les espèces les plus connues se trouve *Euphorbia helioscopia*. Cette plante largement utilisée pour traiter des parasites intestinaux, gonorrhée, le système respiratoire,...etc. a constitué le sujet de plusieurs études qui font déterminer leurs compositions chimiques, ainsi que les propriétés biologiques.



Le présent travail rentre dans le vaste cadre de la recherche de nouvelles substances naturelles extraites de la partie aérienne de *Euphorbia helioscopia*, et l'étude de leurs activités biologiques (antioxydants).

Dans ce présent travail, nous avons fixé les objectifs suivants :

- Préparation des différents extraits (chloroformique, éthyl-acétate et n-butanolique).
- Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes.
- Préparation et détermination des rendements des extraits bruts secs, chloroformique, éthyl-acétate et n-butanolique.
- Enfin, évaluation de l'activité antioxydante des extraits préparés.



Chapitre I :

*Aperçu bibliographique sur le
genre Euphorbia*

I.1. Description du genre *Euphorbia* :

Le genre *Euphorbia* comprend 2000 espèces cosmopolites, arbustives ou arborescentes (espèces tropicales, subtropicales à tendance xérophytique), herbacées annuelles ou vivaces (espèces européennes), coralliformes (espèces de Madagascar), cactiformes épineuses et charnues (espèces de Madagascar) (**Anton, 1974 ; Adjanohoun *et al.*, 1980**).

Ce genre a été remanié de nombreuses fois et divisé en genres distincts, en sous-genre et sections (**Anton, 1974**).

L'espèce étudiée est une plante herbacée vivace de la famille des Euphorbiacées, commune sur le pourtour méditerranéen (**Walter *et Lieth*, 1960-1967**), c'est une Euphorbe arborescente à écorce rouge, sphérique, très ramifié, pouvant atteindre 2 mètres de circonférence, à pousse basale et suc laiteux blanc (**Figure 1**) (**Bayer *et al.*, 1998**).

Les tiges sont assez grêles, jusqu'à 60 cm max., dressées, charnues, glabres, souvent épineuses et poussant par plusieurs en touffe (**Baillon, 1874**). Il y a des tiges érigées tomenteuses, tiges prostrées pubescentes (**Baillon, 1858**) et des tiges quadrangulaires, cylindriques (**Bentham *et Hooker*, 1867**).

Les feuilles sont généralement alternes, soit toutes strictement opposées verticillées dans la partie supérieure de la tige, soit des feuilles alternes à la base (**Akubue *et al.*, 1983**). Elles sont de forme et de taille variables de 4 à 8 mm de long (**Ayensu, 1978**), souvent maculées de rouge ou blanc, des feuilles entières, étroites, aiguës, épaisses, réticulées, très larges et arrondies ou ovales (**Akubue *et al.*, 1983, Baillon, 1858**). L'euphorbe perd ses feuilles en cas de sécheresse (**Bayer *et al.*, 1998**).

Les fleurs sont formées en groupe aux extrémités des branches, lancéolées à étroitement elliptiques, obtuses à pointe rapportée, jusqu'à 6.5 cm de long et 8 mm de large. Ses ombelles à 5-8 rayons fourchus, ramifiés, sont en position terminale. La pseudo fleur en coupe, vert jaunâtre à ovaire dépassant à 3 stigmates, fourchue, présente des écailles à nectar plus ou moins lobées, jaunâtres à rougeâtres, arrondies sur le bord, avec de nombreuses étamines à l'intérieur. La capsule est nue, à trois loges et graines ovoïdes brun opaque, lisses (**Bayer *et al.*, 1998**).

Sa floraison a lieu de Mars à Avril (**Christoper, 2003**). Les fleurs males et femelles sont incluses dans le même involucre, appelé cyathe. Ce dernier de couleur jaune en glomérule



dense, axillaire ou terminal longuement pédicellé et solitaire ou sur une branche latérale courte (Aubreville, 1959).

Le fruit est généralement une capsule tricoque déhiscence, plus rarement une drupe. A maturation, les coques séparent élastiquement de la columelle ; et s'ouvrent dorsalement laissant échapper une ou deux graines. Cette déhiscence est souvent brusque et peut s'effectuer avec bruit, projetant les graines au loin (Adjanooun *et al.*, 1980).



Figure 01 : Photo d'une espèce du genre *Euphorbia* (Bayer *et al.*, 1998).



I.2. Classification botanique :

Règne.....Végétal

Embranchement.....Spermatophytes

Sous Embranchement.....Angiospermes

Classe.....Dicotylédones

Ordre.....Euphorbiales

Famille.....Euphorbiaceae

Genre.....*Euphorbia*Espèce.....*Euphorbia helioscopia* (Jacobsen, 1981)**I.3. Origine et distribution géographique :**

Le genre *Euphorbia* supporte des températures jusqu'à -12° C, est sensible au gel et pousse sur les versants ensoleillés et protégés des zones montagneuses (Christian, 2001). Il se rencontre, à l'état sauvage, dans la péninsule ibérique, en France, dans les péninsules apennine et balkanique et se trouve sur le littoral de la Région Provence-Alpes-Côte d'Azur et en Corse, en Turquie, en Israël, en Jordanie, en Égypte, en Afrique du Nord (elle est rare et occupe quelques remarquables stations sur les rochers calcaires littoraux du Cap Ténès, chenoua, Bejaïa à Cap Carbon et Cap de Garde à Annaba) (Hannache, 2010) et aux États Unis, en Californie (Santa Barbara, Ventura, Los Angeles, Channel Islands National Park, et sur les îles San Nicolas, Santa Catalina et Sant Clemente).

Certaines espèces ont été introduites dans d'autres pays comme arbre d'ornement et affectionnent les terrains rocheux et les pentes les plus chaudes du littoral (Christoper, 2003).

I.4. Utilisations traditionnelles du genre *Euphorbia* :

- Un grand nombre des plantes du genre *Euphorbia* sont utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement des maladies de la peau, gonorrhées, migraine, des parasites intestinaux et comme anti-inflammatoire en Inde (Singh et Meena, 1994).
- D'autres espèces sont utilisées pour le traitement des maladies qui touchent le système



respiratoire (l'asthme, la bronchite, la toux, la coqueluche et l'hémoptysie) (**Ratsimiala et al., 2005**).

- Les plantes du genre *Euphorbia* sont utilisés pour guérir l'œdème, la tuberculose, et comme purgatif et diurétique (**Shi et Jia, 1997**).
- Le latex extrait du genre est utilisé comme poison de pêche. Il est appliqué en médecine à des verrues et utilisé dans le rhumatisme et les névralgies et signalée également comme anti-amibien en raison des terpénoïdes que renferment ses rhizomes et ses parties aériennes (**Oliver-Bever, 1983**).
- Dans le domaine de la pharmacologie, le latex de *Euphorbia* est utilisé comme agent antimicrobien, antiparasitaire dans le traitement de la toux et d'autres maladies comme remède populaire dans la région nord-est du Brésil (**Silva et al., 2007**).
- Les espèces du genre *Euphorbia* sont souvent utilisées comme plantes de couverture dans de nombreuses parties de l'Afrique et sont utilisées dans l'ornementation en aménagement paysager, en raison de leurs formes globales belles, de la sécheresse et de la tolérance à la chaleur (**Adamson, 2011**).
- D'autres espèces peuvent également servir à la production du caoutchouc, son latex est la source du caoutchouc naturel (**Botineau, 2010**).

I.5. Composition chimique du genre *Euphorbia* :

La composition chimique du genre *Euphorbia* est résumée dans le tableau suivant : (Tableau I) (**Heal et Rogers, 1950 ; Gérarde et Guy, 1965 ; Oliver-Bever, 1983 ; Shi et al., 2008 ; Ragasa et al., 2013 ; Zarei et al., 2013 ; Sharma et Janmeda, 2014**).

Tableau I : Les principaux constituants chimiques des Euphorbiacées :

Famille des constituants Chimiques	Constituants chimiques
Alcaloïdes	Pronuciférine, linéarsine, orotonsine, acide hydroxy-4hygrinique.
Acides phénoliques	Acide gallique, acide biglandulinique, acide β -éthylmalique, acide ellagique, acide porbique.



Acides organiques	Alcools, cyclitols, octacosanol, hydrocarbures, hentriacontane. Acides gras des esters de phytyle, β -sitostérol.
Flavonoïdes	Tétrahydroflavones et trihydroflavones, Glycoflavones kaempférol. 2-(3,4-dihydroxy-5-methoxy-phenyl)-3,5-dihydroxy-6,7-dimethoxychromen-4-one.
Les terpènes	Euphorbon (triterpene, quercetol). Tetrahydroingénoïde. Triterpènes tels que bétuline et esters correspondants. Isoprénoïde (sesqui-, di- et triterpènes). Diterpéniques (par exemple, jatrophone, lathyrane, tigliane, daphnane, ingénane, myrsinane, etc.). Triterpènes tétracycliques : euphol, euphorbol, tirucallol, cycloarténol, lanostérol, lanosténol, obtusifoldiérol. Triterpènes pentacycliques : taraxérol et dérivés, friedeline et dérivés, germanicol, β amyryne, polyisoprène.

I.6.La toxicité :

Un grand nombre d'espèces de cette famille sont dangereuses. Certaines sont urticantes, d'autres très toxiques comme majoritairement des Crotonoidées et surtout des Euphorbioidées qui ont un latex irritant et caustique (**Botineau, 2010**). Chez toutes ces espèces, la toxicité est due à la présence d'esters diterpéniques de structure complexe (tiglianes, daphnanes, ingénanes), très irritants au niveau de la peau et des muqueuses, ce sont pour la plupart, des inducteurs de tumeurs, leur toxicité par voie orale est importante chez les animaux mais aussi



chez l'homme (**Gundidza et al., 1993 ; Schmidt et Evans, 1980 ; Bruneton, 1999**).

L'homme a très tôt, exploité la toxicité des Euphorbiacées, il les a incorporé dans des poisons de flèche en Afrique, aux Caraïbes, aussi bien en Malaisie, il utilisait ainsi la toxicité intrinsèque des latex et leur pouvoir adhésif (**Bruneton, 1993**).

Le latex desséché figurait à la pharmacopée française depuis 1949 sous le nom de « gomme résine d'euphorbe », employée dans la pommade vésicante vétérinaire.

Le latex s'écoule par incision, opération dangereuse pour les yeux et les muqueuses des manipulateurs, étant donné ses propriétés vésicantes (**Paris, 1981**).



Chapitre II :

***Les substances bioactives du
genre Euphorbia***

II. Les substances bioactives du genre *Euphorbia* :

II.1. Les polyphénols :

II.1.1. Définition :

Les polyphénols sont des molécules organiques synthétisées par les végétaux. Ils appartiennent à leur métabolisme secondaire et participent à leur défense contre les agressions environnementales (Middleton *et al.*, 2000) (Figure 2). Ils peuvent être conjugués avec un ou plusieurs résidu(s) sucré(s) lié(s) ou alors avec d'autres composés chimiques tels que les acides organiques (Martin *et* Andriambeloson, 2002).

Les polyphénols sont présents partout dans les racines, les tiges, les feuilles et les fleurs de tous les végétaux. Les principales sources alimentaires en ces molécules sont les fruits et légumes, les boissons (vin rouge, thé, café, jus de fruits), les céréales, les graines oléagineuses et les légumes secs. (Bruneton, 1993).

II.1.2. Biosynthèse :

Les polyphénols sont synthétisés selon deux voies biosynthétiques:

- *Celle de l'acide shikimique*, qui conduit après transamination et désamination, aux acides cinnamiques et à leurs nombreux dérivés tels que les acides benzoïques ou les phénols simples (Elicoh-Middleton, 2000 ; Crozier *et al.*, 2006).
- *Celle issue de l'acétate*, qui conduit à des poly β -coesters (polyacétates) de longueur variable menant par cyclisation à des composés polycycliques tels que les dihydroxy-1,8 anthraquinones ou les naphthoquinones (Mazza, 1995).



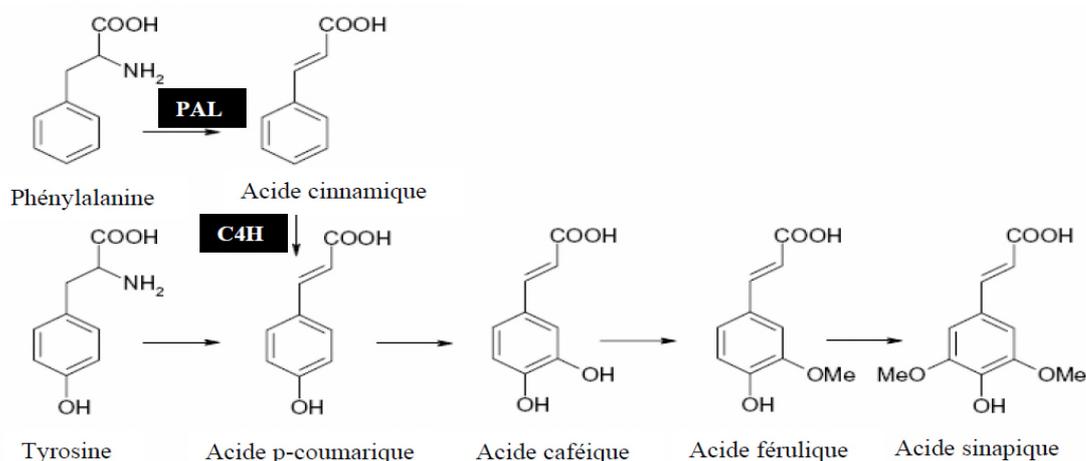


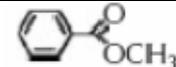
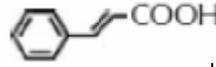
Figure 02 : Biosynthèse des composés phénoliques les plus largement distribués par la voie du shikimate (Crozier *et al.*, 2006).

PAL : Phénylalanine ammonia-lyase ; C4H : Cinnamique 4 -hydroxylase.

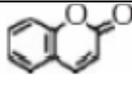
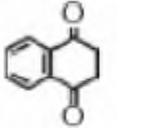
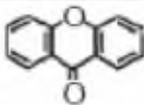
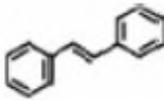
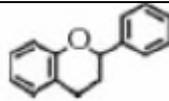
II.1.3. Classification des polyphénols :

Les polyphénols forment un très vaste ensemble de substances chimiques, ils peuvent être classifiés selon le nombre et l'arrangement de leurs atomes de carbones (Tableau II).

Tableau II : Structure du squelette des polyphénols (Crozier *et al.*, 2006).

Nombre de carbone	Squelette	Classification	Exemple	Structure de base
7	C ₆ -C ₁	Acides phénols	Acide gallique	
8	C ₆ -C ₂	Acétophénonnes	Gallacetophénone	
8	C ₆ -C ₂	Acides phénylacétique	Acide p-hydroxyphényl acétique	
9	C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinamiques	Acide p-coumarique	



9	C ₆ -C ₃	Coumarines	Esculetine	
10	C ₆ -C ₄	Naphthoquinones	Juglone	
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Xanthones	Mangiferine	
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes	Resveratrol	
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes	Naringénine	

II.1.4. Les activités biologiques des polyphénols :

Les polyphénols sont associés à de nombreux processus physiologiques impliqués dans la protection la plante lorsqu'elle est soumise à des blessures mécaniques (**Bahorun, 1997**).

La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes (les champignons, les bactéries) est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques (**Makoi et Ndakidemi, 2007**).

Ils montrent des activités diverses : ce sont des antiagrégants plaquettaires, des anti-inflammatoires, des anti-allergènes, anti-hyperplasiques, des anti-thrombotiques, des anti-tumoraux, Vasodilatateurs et antioxydantes (**Wollny et al., 1999 ; Middleton et al., 2000 ; Andriambeloso et al., 1997 ; Martin et Andriambeloso, 2002 ; Gee et Johnson, 2001**).

II.2. Les flavonoïdes :

II.2.1. Définition :

Les flavonoïdes sont des molécules polyphénoliques, formant un groupe de plus de 6000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires (**Erlund, 2004**). Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux (**Havsteen, 2002**). Les flavonoïdes sont rencontrés dans les fruits, légumes et les boissons d'origines végétales (**Mira et al., 2002**).



Les flavonoïdes comprennent quinze atomes de carbones avec deux noyaux aromatiques reliés par un pont à trois carbones (C6-C3-C6) (**Figure 3**) (**Harborne, 1993**), Ils sont présents en concentrations élevées dans l'épiderme des feuilles et la peau des fruits (**Koes *et al.*, 1994 ; Piepoint, 2000**).

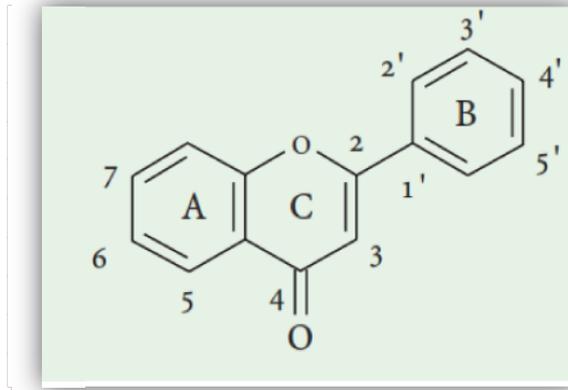


Figure 03 : La structure de base des flavonoïdes (**Di Carlo *et al.*, 1999**).

II.2.2. Rôles des flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont capables de moduler l'activité de certains enzymes et de modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires (**Ghedira, 2005**) et ont des rôles importants et variés, ils sont impliqués dans le processus de la protection UV, la pigmentation, la stimulation de l'azote fixée et la résistances aux maladies (**Koes *et al.*, 1994 ; Pierpoint, 2000**).

II.2.3. Biosynthèse des flavonoïdes :

Les flavonoïdes se trouvent d'une manière systématique dans toutes les plantes vasculaires. Ils possèdent tous le même élément structural de base, car ils dérivent d'une origine biosynthétique commune.

Le cycle A est formé à partir de trois molécules de malonyl-coenzyme A (malonylCoA), issues du métabolisme des acides gras.



Les cycles B et C proviennent eux aussi du métabolisme du glucose, mais par la voie du shikimate via la phénylalanine qui est convertie en p-coumarate puis en p-coumaroyl-CoA, le p-coumaroyl-CoA et les 3 malonyl-CoA se condensent en une seule étape enzymatique pour former une chalcone, la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone (réaction catalysée par la chalcone synthétase). Le cycle C se forme par cyclisation de la chalcone, réaction catalysée par la chalcone isomérase qui induit une fermeture stéréospécifique du cycle conduisant à un seul énantiomère 2(S)-flavanone : la naringénine. Ce cycle s'hydrate ensuite pour former les différentes classes de flavonoïdes (**Kanoun, 2011**).

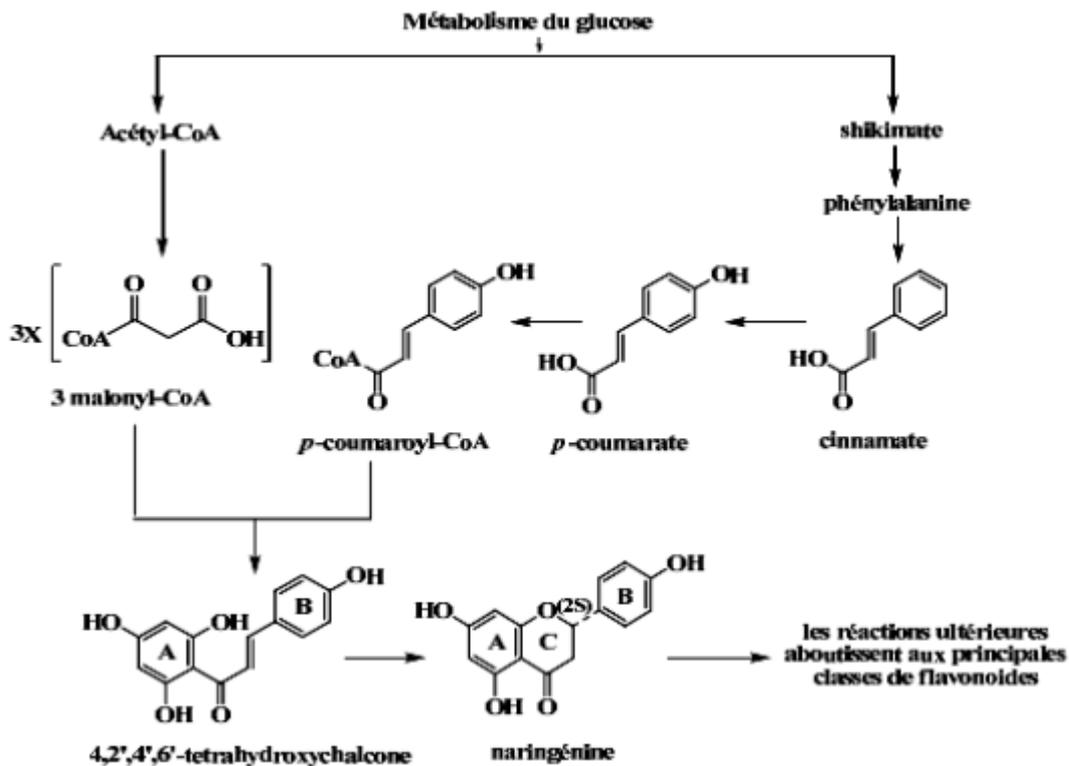


Figure 04 : La biosynthèse des flavonoïdes illustrant les voies de l'acétyl CoA et de la phénylalanine (**Lhuilier, 2007**).



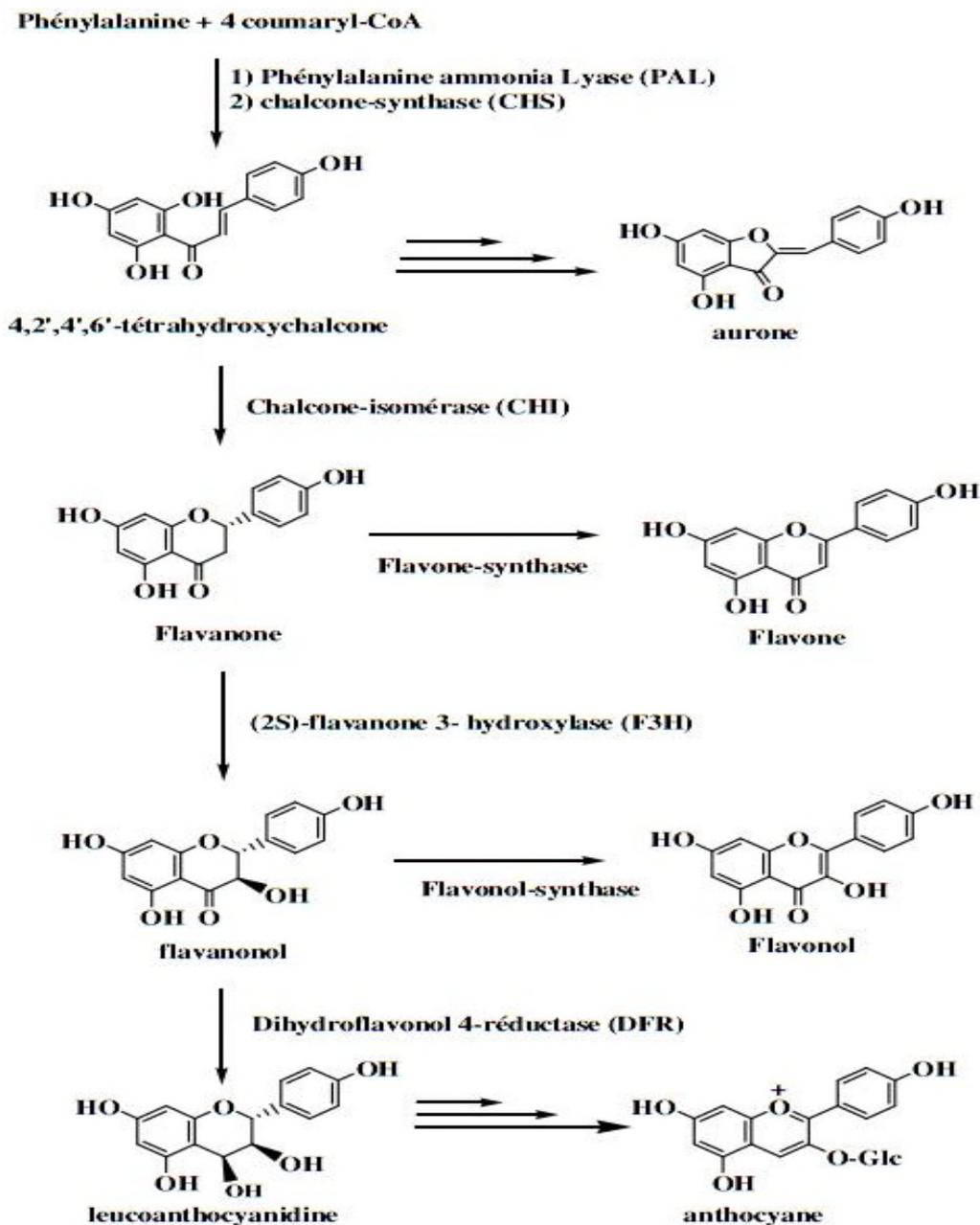


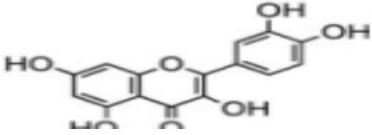
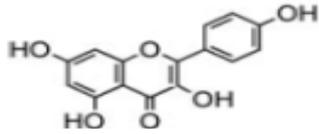
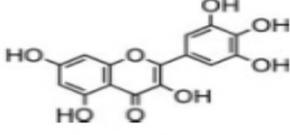
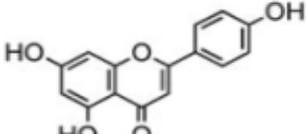
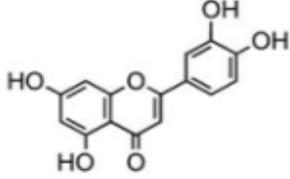
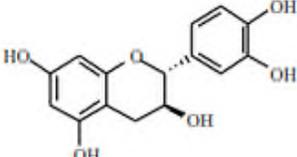
Figure 05 : Illustration des différentes réactions enzymatiques conduisant aux principales classes de flavonoïdes (Marfak, 2011).



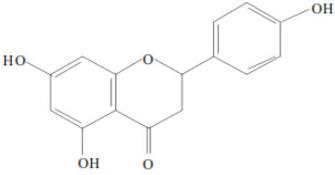
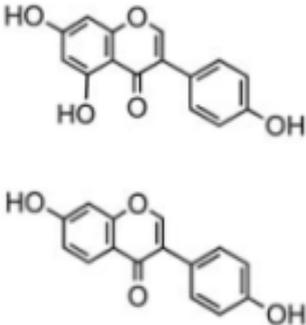
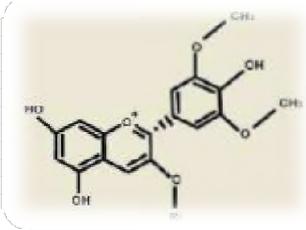
II.2.4. Classifications :

Il y a six classes de flavonoïdes, qui diffèrent par leur structure chimique : Flavonols, flavones, flavanols, flavanones, isoflavones et anthocyanidines (Medié-Šarié *et al.*, 2004).

Tableau III : Les principales classes de flavonoïdes (Di Carlo *et al.*, 1999 ; Vertuani *et al.*, 2004).

Classes	Exemples	La structure de base
Flavonols	Quercétine	
	Myricétine	
	Kaempférol	
Flavones	Apigénine	
	Lutéolin	
Flavanols	Catéchine	



Flavanones	Naringénine	
Isoflavones	Génistéine Daidzéine	
Anthocyanidines	Malvidine	

II.2.5.Effets des flavonoïdes:

- Les flavonoïdes sont des inhibiteurs enzymatiques à l'égard de l'aldose réductase (**Chaudhry, 1983 ; Nakai *et al.*, 1985 ; Fernández *et al.*, 2005**), de la phospholipase A2 (**Gil *et al.*, 1994 ; Kim *et al.*, 2001**) et des enzymes de l'inflammation (**Havsteen, 2002**).
- Ce sont des protecteurs vasculaires, ils agissent sur les vaisseaux sanguins sous forme d'activité vitaminique « P » (**Beretz *et Gazenave*, 1991**).
- Antioxydants et piègeurs des radicaux libres (**Miller, 1996 ; Bors *et al.*, 1997 ; Cao *et al.*, 1997**) tels que les radicaux hydroxyles (OH), anions superoxydes (O₂⁻) et radicaux peroxylipidiques.



- Ils sont utilisés depuis des siècles en médecine traditionnelle dans le traitement des affections hépatiques (**Gilani et al., 1997 ; Valenzuela et Guerra , 1985 ; Jassim et Naji, 2003**).
- Antiallergiques, Ils agissent par inhibition des enzymes qui favorisent la libération d’histamine à partir des mastocytes et des basophiles : l’AMPc phosphodiesterase et la Ca⁺⁺ ATPase (**Amella et al., 1985 ; Berg et Daniel, 1988 ; Yamamura et al., 1998 ; Kotani et al., 2000**).
- Anti-ulcérogène, les flavonoïdes sont capables de protéger la muqueuse gastrique contre divers agents ulcérogènes (**Villar et al., 1987**).
- Comme antibactériens et antiviraux les flavonoïdes atténuent le pouvoir infectieux ou affectent la réplication intracellulaire d’autres virus tels que le virus respiratoire syncytial (VRS), l’herpès simplex virus (HSV) et les adénovirus (**Serkedjieva et Ivancheva , 1998 ; Gonçalves et al., 2001**).



Chapitre III :
Les Radicaux libres

III. Les radicaux libres :

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se produire dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de ces composés qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux primaires. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (**Passwater, 1997**).

III.1. Définition :

Par définition, Un radical libre est toute espèce capable d'existence indépendante (d'où le terme «libre») qui contient un ou plusieurs électrons non appariés sur leur orbitale externe. (**Aruoma et Halliwell, 1998**). Cette caractéristique leur confère une grande instabilité et la possibilité de réagir avec de nombreux composés dans des processus le plus souvent non spécifique. Ils ont une affinité particulière pour les lipides, des protéines et des acides nucléiques (ADN) en provoquant leur oxydation. La durée de vie des radicaux libres est très courte (**Halliwell, 1993 ; Dröge, 2002 ; Tandon et al., 2005**). Ils réagissent avec les tissus voisins causant des lésions oxydatives (**Halliwell et Gutteridge, 1999**). Les radicaux libres sont formés à partir de molécules par le clivage homolytique d'une liaison chimique et par des réactions redox (**Cheeseman et Slater, 1993**). Ce caractère chimique rend les radicaux libres fortement réactifs (**Mahantesh et al., 2012**).

III.2. Origine des radicaux libres :

Les radicaux libres sont produits dans l'organisme au cours du métabolisme normal. Cette production augmente en rapport avec l'élévation de la consommation d'oxygène (**Gauche et Hausswirth, 2006**). Plusieurs mécanismes et systèmes qui sont responsables de la production de radicaux libres ont été identifiés jusqu'à présent, parmi eux nous citons :

- Des fuites d'électrons de la chaîne respiratoire mitochondriale (**Halliwell et Gutteridge, 1999**).
- La production de superoxyde pendant la phagocytose, et la libération de NO par l'endothélium, qui constitue un des mécanismes de régulation du tonus vasculaire (**Mette et Berger, 2006**).



- Exposition à des agressions de l'environnement, comme la fumée de cigarettes et des polluants de l'ozone (**Gutteridge, 1993; Poljsak, 2011**).
- Les radiations UV, les rayons X, les rayons gamma et un rayonnement de micro-ondes (**Slater, 1985**).
- Réactions catalysées par des métaux (**Tandon et al., 2005**), par exemple la réaction de Fenton est basée sur la production des radicaux hydroxyle à partir de la décomposition du peroxyde d'hydrogène catalysée par des sels ferreux (**Ménana, 2010**).
- ❖ Les ions métalliques ont une forte influence sur la chimie de O_2 et de ses produits de réduction. La réaction Fenton bien connu est déclenchée lorsque Fe^{2+} entre en contact avec H_2O_2 et produit $\bullet OH$ (**Oshimic et al., 1973**).

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \bullet OH + OH^-$$
- ❖ H_2O_2 réagit également avec $O_2\bullet$ pour initier la réaction de Haber-Weiss et produit $\bullet OH$ en présence de Fe^{2+} (**Ray et Husain, 2002**).

$$\left. \begin{array}{l} O_2\bullet + Fe^{3+} \rightarrow O_2 + Fe^{2+} \\ H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow \bullet OH + OH^- + Fe^{3+} \end{array} \right\} O_2\bullet + H_2O_2 \rightarrow O_2 + \bullet OH + OH^-$$
- Les enzymes productrices de ROS comme cytochrome P₄₅₀ oxydase (**Bandyopadhyay et al., 1999**), xanthine oxydases et la peroxydation lipidique (**Kerr et al., 1996 ; Reth et Wienands, 1997 ; Dröge, 2002**).
- ROS produites par le métabolisme de l'acide arachidonique (**Kontos, 2001**).

III.3. Le stress oxydatif :

III.3.1. Définition :

Le stress oxydant se définit donc comme la perturbation de l'équilibre endogène entre radicaux libres et antioxydants de courte ou longue durée provoquant des effets délétères dus soit à une défense antioxydante défailante, soit à un état pro-oxydatif accru (**Alonso de Vega et al., 2000**).



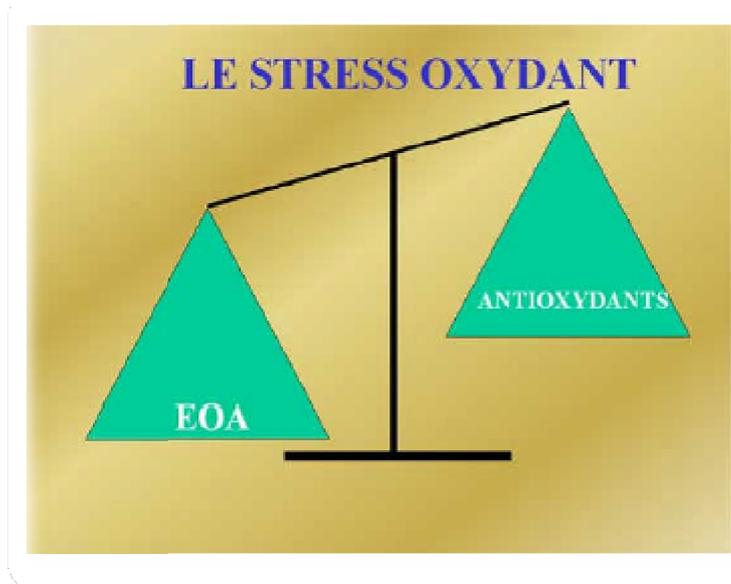


Figure 06 : Balance oxydants/ antioxydants en faveur d'un stress oxydatif (**John et Schneider, 2003**).

III.3.2. Les antioxydants :

III.3.2.1. Définition :

Une définition large du terme antioxydant est toute substance qui, présente en faible concentration comparés à celle du substrat oxydable, retarde ou prévient de manière significative l'oxydation de ce substrat (**Halliwell et Gutteridge, 2007**).

Les antioxydants sont des composés très divers qui regroupent des protéines à activité enzymatique (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase, glutathion réductase) (**Young et al., 2001**) et non enzymatique (vitamine E, β -carotène, vitamine C, acide urique...etc) (**Kohen et al., 2002**).

III.3.2.2. Les antioxydants enzymatiques :

Il s'agit principalement de quatre enzymes : superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathion peroxydase (GPx) et glutathion réductase (GR). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du O_2 et du H_2O_2 conduisant finalement à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire (**Lehucher-Michel et al., 2001**).



a) La superoxyde dismutase :

La superoxyde dismutase est un groupe de métallo-enzymes qui catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et le dioxygène (**Hohmann, 1997**). Il y a trois principaux superoxyde dismutases : SOD1 (Cu/Zn-SOD), principalement trouvé dans le cytosol, SOD2 (Mn-SOD) qui se trouve dans la matrice de la mitochondrie et SOD3 (EC-SOD), une protéine tétramère sécrétée dans le compartiment extracellulaire. Ces enzymes sont la première ligne de défense cellulaire contre le stress oxydatif (**Halliwell et Gutteridge, 1992**).

b) La catalase :

La catalase est une enzyme tétramère, chaque unité contenant la base hème et une molécule de NADPH localisée principalement dans les peroxysomes, il empêche la génération de radicaux hydroxyle par dismutation du peroxyde d'hydrogène. Il est particulièrement abondant dans les hépatocytes et les érythrocytes (**Tache, 2000 ; Warner et al., 2004**).

c) Les glutathions peroxydases et réductases :

Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries. La glutathion peroxydase est une sélénoenzyme (Se-GPx) qui joue un rôle très important dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'autres hydroperoxydes résultants de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de ces dérivés réactifs avec l'oxydation de substrats réducteurs comme le glutathion (GSH). La glutathion réductase (GR) quant à elle a pour rôle de régénérer le GSH à partir du glutathion oxydé (GSSG) tout en utilisant le NADPH comme un cofacteur (**Martinez-Cayuela, 1995 ; Sorg, 2004**). La synthèse du glutathion, un des antioxydants le plus important de l'organisme, dépend fortement de l'apport nutritionnel en acides aminés tels que la méthionine (**Roussel, 2009**).



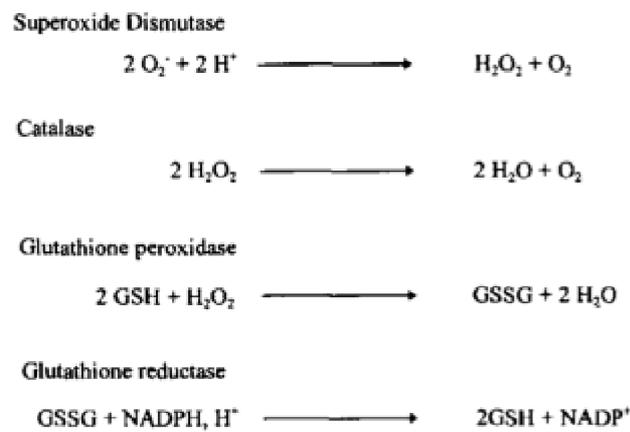


Figure 07 : Les réactions catalysés par des antioxydants enzymatiques (**Gaté et al., 1999**).

III.3.2.3. Les antioxydants non enzymatiques :

Plusieurs substances pouvant agir en tant qu'antioxydant in vivo ont été proposé (**Svoboda et Hampson, 1999**). Elles peuvent être trouvées dans les membranes cellulaires (molécules liposolubles comme la vitamine E, ou les caroténoïdes) ou dans le cytoplasme (molécules solubles dans l'eau telle que la vitamine C) (**Willcox et al., 2004**).

- **L'acide ascorbique (AA) :**

L'acide ascorbique ou la vitamine C (**Figure 8**) est l'une des vitamines importantes et essentielles pour la santé humaine. Elle est nécessaire pour de nombreuses fonctions physiologiques de la biologie humaine (**Naidu, 2003**). La vitamine C est très sensible à l'air, à la lumière et à la cuisson (**Médart, 2009**). L'ascorbate est un antioxydant puissant hydrosoluble, capable de piéger, à des concentrations très faibles, les espèces réactives d'oxygène tels que l'hydroxyle et les composés azotés qui peuvent causer des dommages oxydatifs à des macromolécules telles que les lipides et l'ADN (**Carr et al., 1999**).



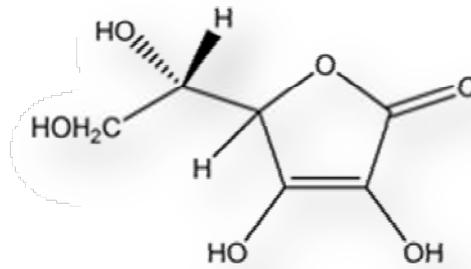


Figure 08 : Structure de l'acide ascorbique (vitamine C) (Reginald, 2000).

- **Vitamine E :**

La vitamine E (α -tocophérol) est le principal antioxydant lipophile qui peut réduire les radicaux libres tels que les lipoperoxydes (Frei *et Ames*, 1998). On le trouve principalement dans les œufs, céréales et les graines (Bode *et al.*, 1990). Il protège contre les blessures de l'endothélium (Boogaerts *et al.*, 1984 ; Hennig *et Boissonneault*, 1989) et aussi contre les dommages de la membrane du myocarde (Janero *et Burghards*, 1989). Comme un rôle essentiel, elle s'insère au sein des membranes cellulaires où elle empêche la propagation des phénomènes de lipoperoxydation (Médart, 2009).

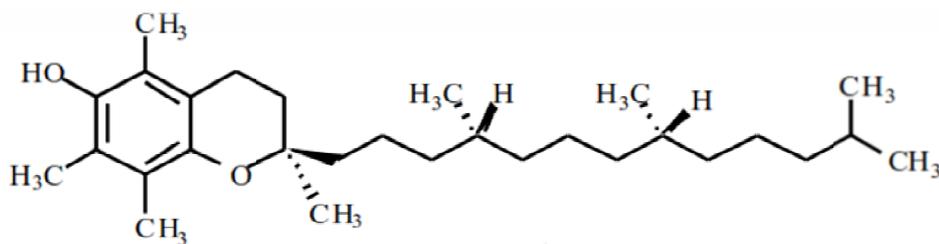


Figure 09 : Structure de la vitamine E (Vertuani *et al.*, 2004).



- **Les caroténoïdes :**

Les caroténoïdes tel que le β -carotène constituent une vaste famille de composés qui sont généralement des bons capteurs de radicaux hydroxyles et peroxydes ce qui les rend susceptibles d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidique (**Gardès-Albert *et al.*, 2003**). Ils sont trouvés dans les légumes et fruits, également dans le lait, protègent contre les dommages oxydants en augmentant le métabolisme de désintoxication, empêchent l'expression des oncogènes et augmentent l'activité de communication de gap junctions (**Hale, 2003**).

- **Les oligoéléments :**

Les oligoéléments ou les éléments-trace (zinc, sélénium, cuivre, manganèse) constituent des cofacteurs nécessaires aux activités des enzymes antioxydants (**Figure 10**). D'autres constituants de l'alimentation, comme les vitamines du groupe B, le chrome ou le magnésium, agissent comme des antioxydants indirects via la régulation de l'homocystéinémie, l'amélioration de la sensibilité à l'insuline (chrome) ou la lutte contre l'inflammation (magnésium).

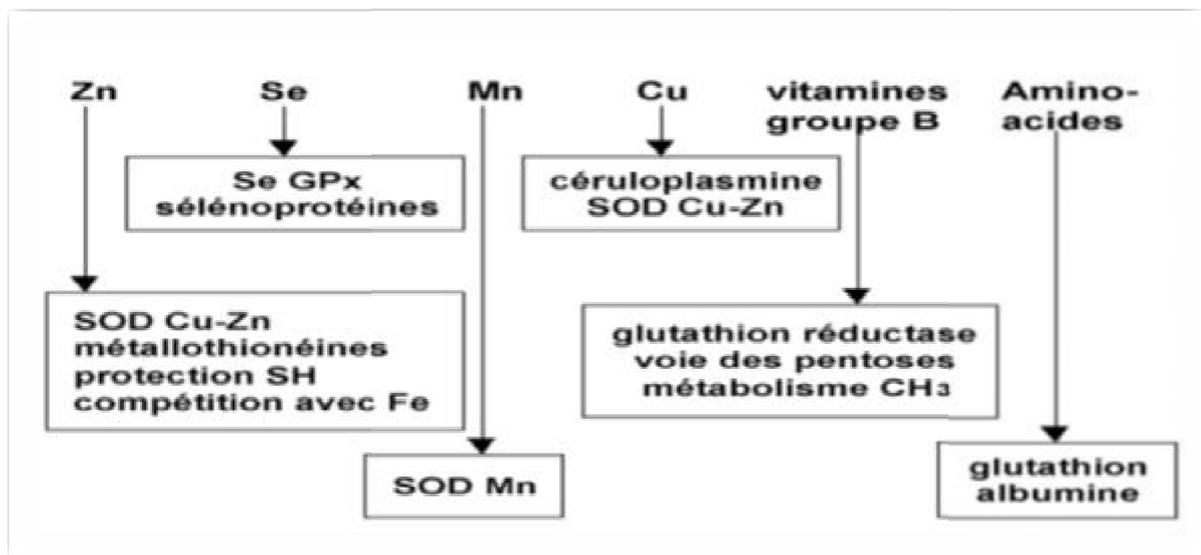


Figure 10 : Oligoéléments nécessaires aux activités des enzymes antioxydantes (**Roussel, 2009**).



- **Les polyphénols :**

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux et présents dans tous les organes de la plante (**Lugasi et al., 2003**). Ils sont capables de piéger les radicaux libres (**Middleton et al., 2000**). Les polyphénols agissent contre la peroxydation lipidique par deux façons : par la protection des lipides contre les initiateurs de l'oxydation ou par stabulation de la phase de propagation (**Laguerre, 2007**).

- **Les flavonoïdes :**

Les flavonoïdes sont des substances naturelles présentes dans tout le règne végétal. Il peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant : par capture directe des espèces réactives de l'oxygène, par chélation de métaux de transition comme le fer le cuivre ou par inhibition de l'activité de certaines enzymes responsables de la production des espèces réactives de l'oxygène comme la xanthine oxydase (**Lahouel et al., 2006**).



Chapitre IV :

Matériels et Méthodes



IV. Matériels et méthodes :

IV.1. Matériels :

IV.1.1. Matériel végétal utilisé :

La partie aérienne (tiges, feuilles, fleurs et fruits) d'*Euphorbia helioscopia* a servi comme matériel végétal pour notre étude. La plante *Euphorbia helioscopia* a été récoltée au mois de mars 2013 dans la région de Bejaïa. Un échantillon de référence est conservé au niveau du laboratoire.

IV.1.2. Appareils et réactifs :

Le matériel et réactifs utilisés pour l'extraction des composés phénoliques ainsi que l'étude de l'activité antioxydant sont reportés en annexe (**Annexe**).

IV.2. Méthodes :

IV.2.1. Préparation de la poudre végétale :

Les échantillons d' *Euphorbia helioscopia* sont bien lavés afin d'éliminer la poussière et toutes particules, puis séchés à l'air libre et à l'abri de la lumière, la plante est ensuite réduite en poudre fine à l'aide d'un broyeur électrique « **KIKA Labortechnik** ».

IV.2.2. Préparation de l'extrait brut des composés phénoliques :

L'extraction des composés phénoliques de la partie aérienne d' *Euphorbia helioscopia* a été effectuée suivant le protocole schématisé sur la **Figure 11**.

IV.2.3. Fractionnement de l'extrait brut :

L'extrait brut des composés phénoliques est fractionné, en utilisant une série de solvants à polarité croissante pour avoir 03 extraits différents (**Figure 11**).



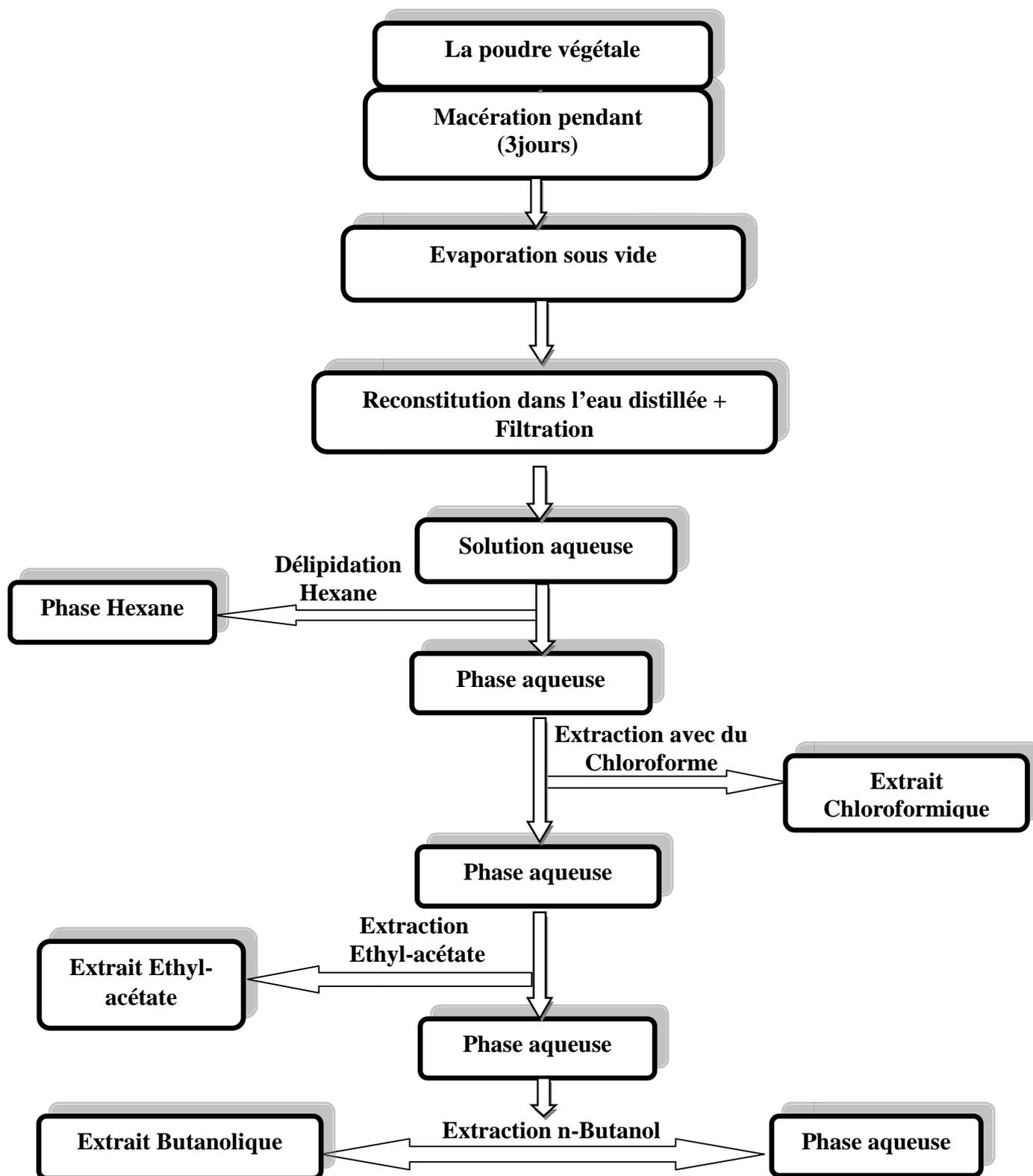


Figure 11 : Les étapes du fractionnement de l'extrait brut de la partie aérienne d'*Euphorbia helioscopia*



IV.2.4. Taux d'extraction des composés phénoliques et des fractions:

Le rendement des extractions effectuées pour chacun des solvants utilisés a été calculé par la formule suivante :

$$R(\%) = (M_0 \times 100) / M$$

R (%) : Rendement exprimé en %.

M : Masse en gramme de l'extrait sec résultant.

M₀ : Masse en gramme du matériel végétal traité.

IV.3. Dosage des substances bioactives :

IV.3.1. Dosage des composés phénoliques :

❖ Principe :

La quantification des polyphénols a été réalisée par spectrophotométrie selon la méthode de Folin-Ciocalteu (**Singleton *et al.*, 1999**): ce réactif de couleur jaune est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$).

Lorsque les polyphénols sont oxydés, ils réduisent le réactif Folin-Ciocalteu en un complexe ayant une couleur bleue constitué d'oxyde de tungstène et de molybdène. La coloration bleue produite possède une absorption maximale aux environs de 750 nm.

L'absorbance, par référence à une gamme étalon obtenue avec un acide phénolique (acide gallique), permet de déterminer la quantité de polyphénols présente dans un extrait. Elle est exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique par g de l'extrait. L'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés (**Boizot *et charpentier*, 2006**).



❖ Mode opératoire :

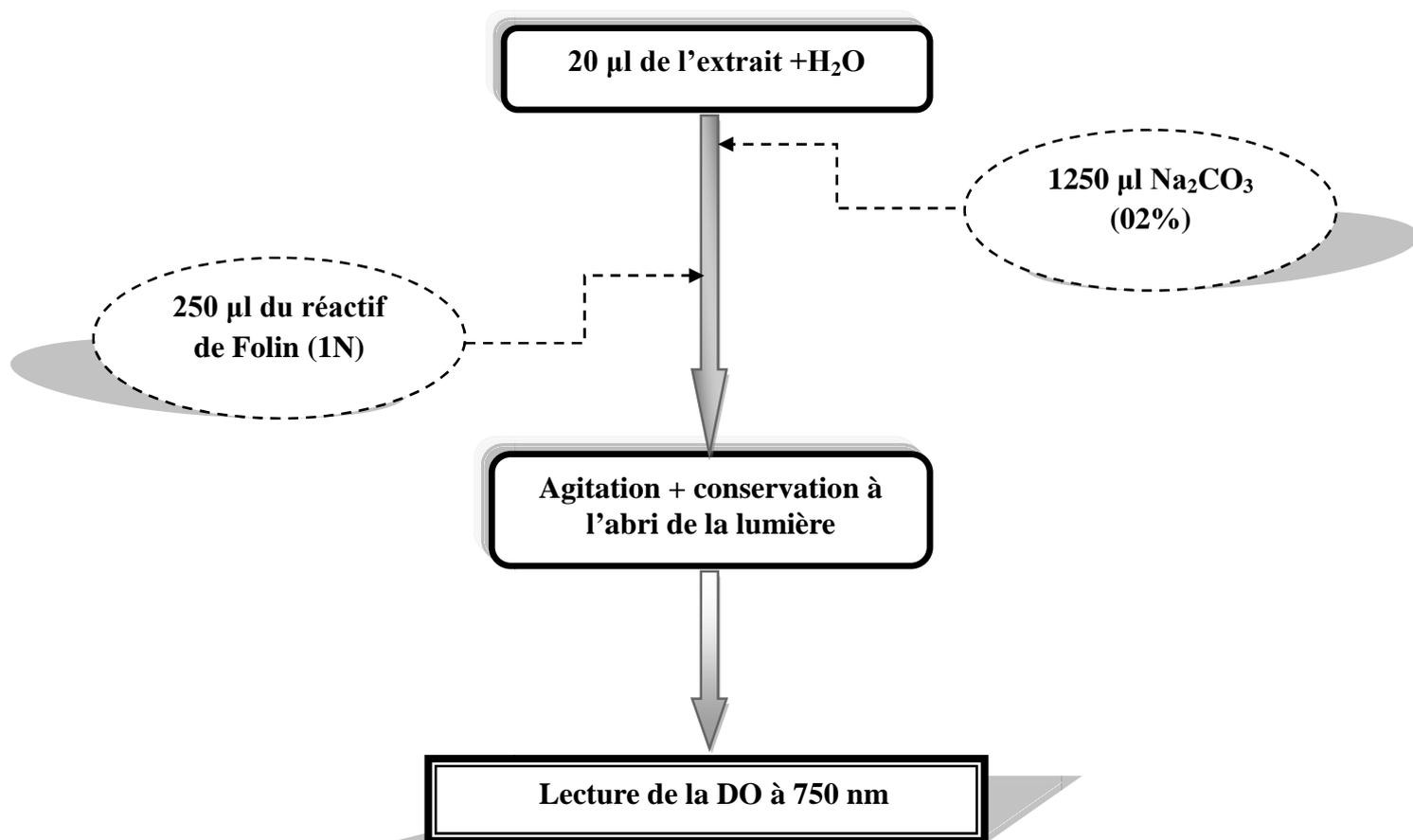


Figure 12: Dosage des composés phénoliques (Singleton *et al.*, 1999).

IV.3.2. Dosage des flavonoïdes :

❖ Principe :

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode basée sur la formation de complexes entre les composés phénoliques et le trichlorure d'aluminium. Les complexes produits sont de couleur jaune absorbent à 430 nm (Djeridane *et al.*, 2006).



❖ Mode opératoire :

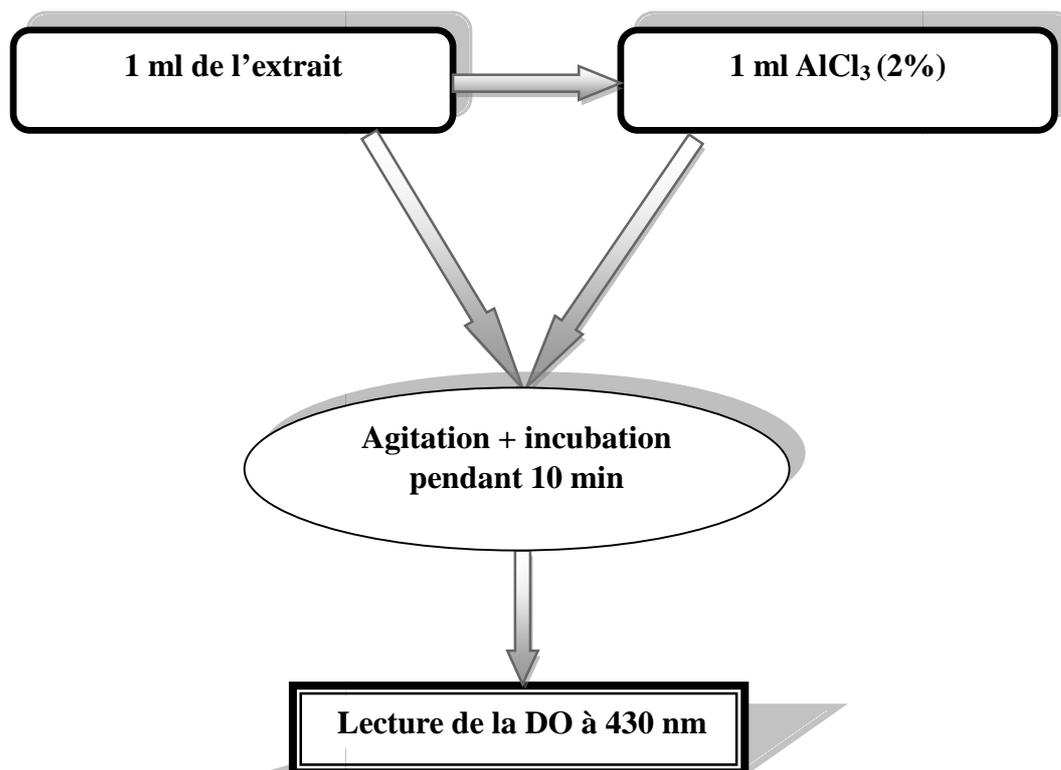


Figure 13 : Dosage des flavonoïdes (Djeridane *et al.*,2006).

IV.4.Détermination de l'activité antioxydant :

IV.4.1.Mesure du pouvoir réducteur :

❖ Principe :

Ce test est basé sur la capacité de l'antioxydant de réduire le fer ferrique Fe^{+++} ($FeCl_3$) en fer ferreux Fe^{++} ($FeCl_2$) en présence d'un agent chromogène le ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$.

- L'intensité du complexe de couleur bleu est proportionnelle à la concentration en antioxydant.



❖ Mode opératoire :

Le pouvoir réducteur des extraits de *Euphorbia helioscopia* est déterminé selon la méthode de Oyaisu *et al* (1986) in Amoroweiz *et al* (2004).

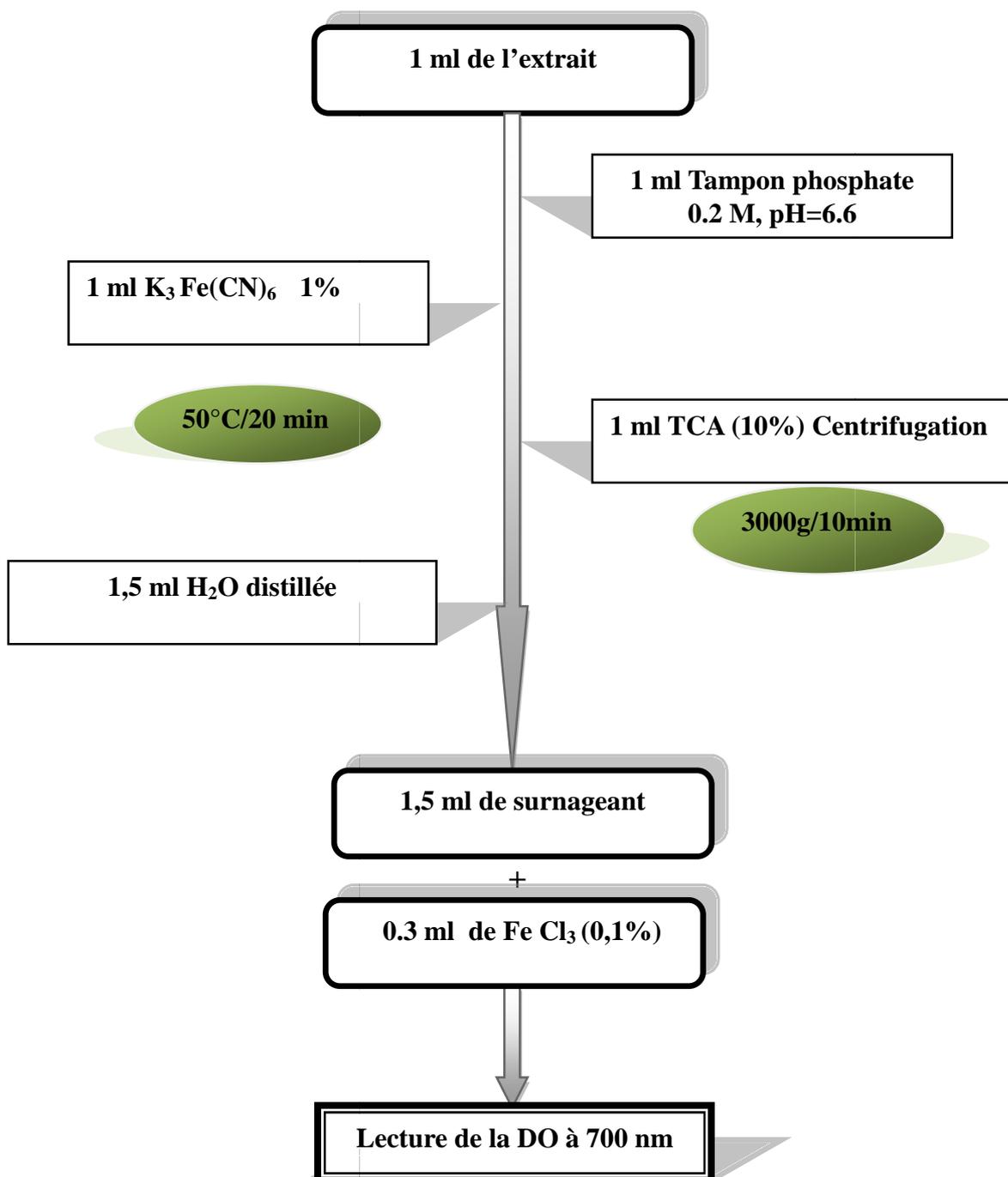


Figure 14 : Mesure du pouvoir réducteur Oyaisu *et al* (1986) in Amoroweiz *et al* (2004).



Chapitre V :
Résultats et discussion

V.1. Taux d'extraction de l'extrait brut :

L'extraction des composés phénoliques de la partie aérienne d'*Euphorbia helioscopia* a été faite à l'aide de la méthode de macération à froid, et le calcul du rendement indique que le taux de l'extrait brut de la partie aérienne atteint **11.16 %**. Ce taux est comparable à celui trouvés par **Abu Arra Basma et al.(2011)** avec un rendement de **11.1%** pour les feuilles et il reste supérieur à celui des autres organes où on a enregistré un taux de **7.3 %, 4.7% et 4.1%** pour les tiges, les fleurs et les racines respectivement. Cette différence est due aux conditions et la période de récolte ainsi que le protocole d'extraction.

V.2. Taux d'extraction des fractions :

Pour chaque extrait obtenu suite au fractionnement, le rendement à été calculé et les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau IV: Tableau récapitulatif regroupant les rendements des différents extraits.

Matériel végétale	Extrait	Rendement
<i>Euphorbia helioscopia</i>	Chloroforme	0.07
	Ethyl-acétate	0.1
	Butanol	1

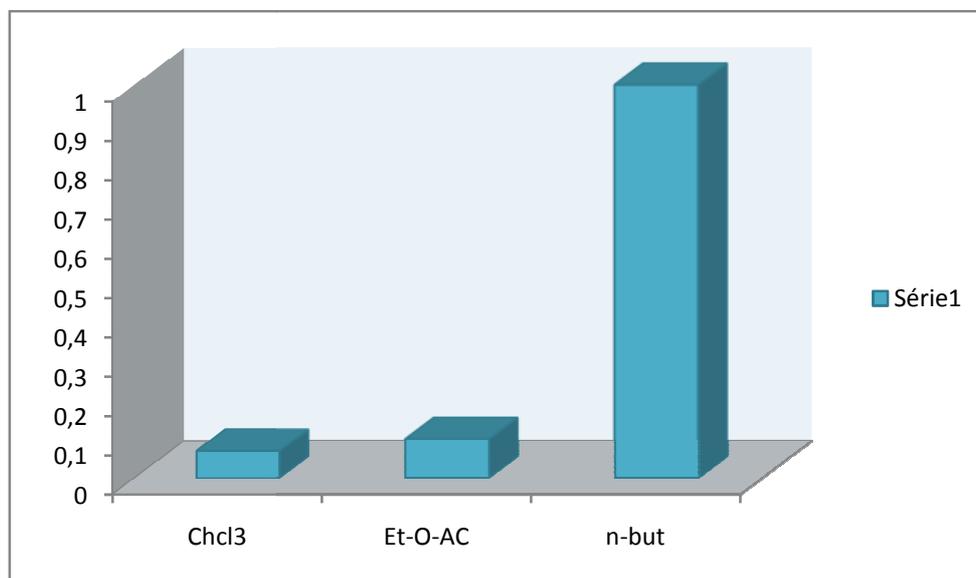


Figure 15 : Histogramme du rendement d'extraction.



Les résultats obtenus montrent que parmi les différentes fractions de l'extrait brut, l'extrait du n-butanol est plus rentable avec un taux de 1%, suivi par l'éthyl-acétate avec 0.1% puis par l'extrait chloroformique qui donne le taux le plus faible de 0.07%. Cela s'explique par la nature des molécules qui existe dans nos différents extraits. Ainsi les molécules polaires, malgré leur répartition entre deux phases (fraction butanolique et fraction d'éthyl-acétate), leur concentration reste supérieure à celle des molécules apolaires se trouvant dans l'extrait chloroformique. Ces résultats indiquent une richesse de l'extrait brut de la plante utilisée en composés polaires.

V.3. Dosage des composés phénoliques :

V.3.1. Dosage des polyphénols totaux :

L'acide gallique (10-40 µg/ml) est le standard utilisé pour établir la courbe d'étalonnage (**Figure 16**) à partir de laquelle la concentration des polyphénols totaux de l'extrait éthyl-acétate est calculée. La valeur trouvée est de 51,40 mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/ g d'extrait).

Ce dosage quantitatif des composés phénoliques totaux dans l'extrait de *Euphorbia helioscopia* montre une richesse de l'extrait en composés phénoliques mais la quantité enregistrée reste inférieure à celles trouvées par **Abu Arra Basma et al. (2011)** sur *E. hirta*. Ces chercheurs ont obtenu les taux en composés phénoliques suivants : 206,17±1,95 mg EAG/g, 117,08±3,10 mg GAE/g, 83,15 ±1,19 mg GAE/g et 65,70 ±1,72 mg GAE/g pour les feuilles, les fleurs, les racines et les tiges respectivement. Les deux dernières renferment des taux comparables à celui de notre plante sachant que nous avons utilisé toute la partie aérienne de la plante et que l'extrait brut a été fractionné.



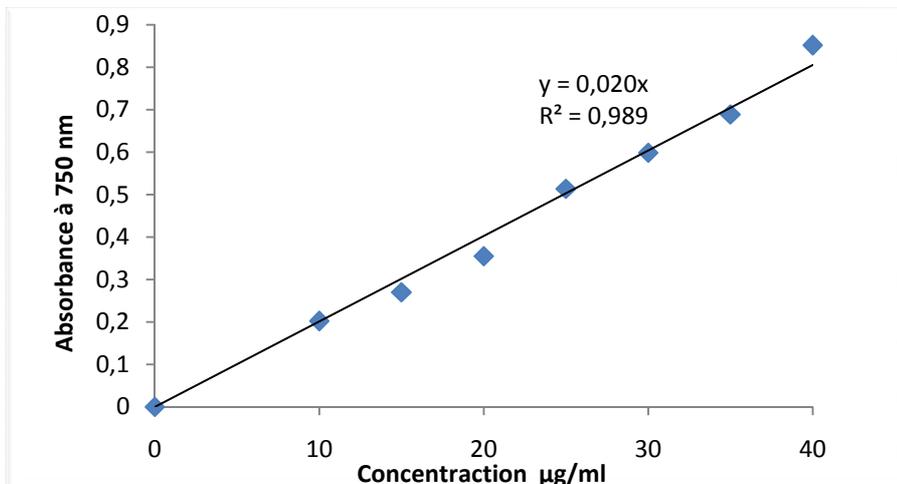


Figure 16 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

V.3.2. Dosage des flavonoïdes :

Les flavonoïdes constituent la classe polyphénolique la plus importante, avec plus de 6000 composés (Gomez-Caravaca *et al.*, 2006).

La concentration des flavonoïdes dans l'extrait est calculée à partir de la courbe d'étalonnage établie avec la quercétine (2-14 µg/ml) (Figure 17). Le taux des flavonoïdes de notre plante est de 2,62 en mg équivalent de quercétine par g d'extrait (mg EQ/g d'extrait) qui reste largement inférieures à ceux trouvés par Abu Arra Basma *et al.* (2011) qui est de 37.970 ± 0.003 mg CEQ/g pour les feuilles avec un taux le plus élevé, suivi par les fleurs avec une valeur de 35.200 ± 0.002 mg CEQ/g, et ensuite par les racines et tiges avec un taux de 24.350 ± 0.006 mg CEQ/g et 24.120 ± 0.004 mg CEQ/g respectivement. Cette différence peut être expliquée par la méthode d'extraction. Dans notre travail, nous avons procédé à l'extraction de ces molécules à partir de toute la partie aérienne alors que Abu Arra Basma *et al.* (2011) ont utilisé les organes aériens séparés, ceci d'une part, d'autre part, notre extrait brut a été fractionné par des solvants de polarités croissantes par contre les chercheurs cités précédemment ont utilisé les extraits bruts directement.



On remarque également que le taux des flavonoïdes dans notre plante est largement inférieure à celui des composés phénoliques donc notre extrait peut contenir d'autres classes de composés phénoliques.

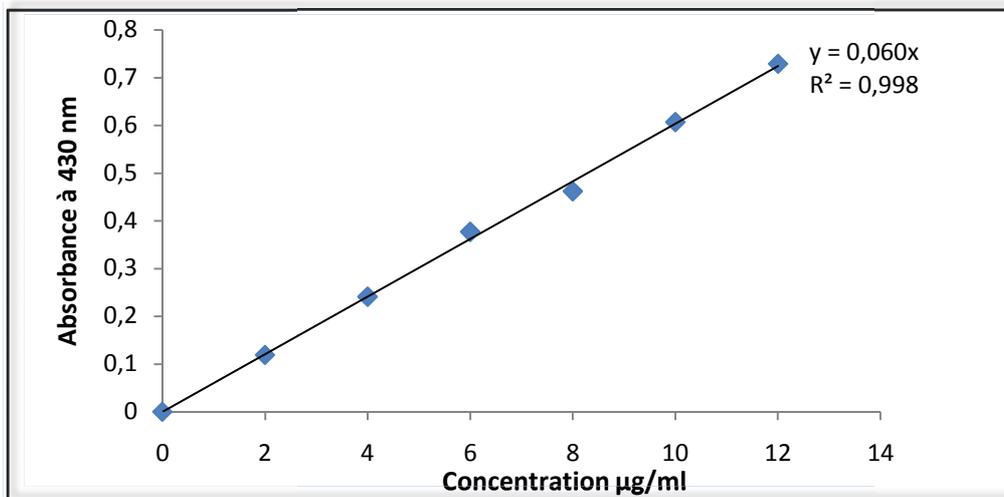


Figure 17 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.

V.4. Etude de l'activité antioxydante

V.4.1. Mesure du pouvoir réducteur

L'activité antioxydante de l'extrait de la plante étudiée a été évaluée en utilisant la méthode du pouvoir réducteur. Cette dernière est un essai simple, rapide et reproductible (**Benzie et Strain, 1996**).

La présence des molécules bioactives dans l'extrait de la plante provoque la réduction de Fe^{3+} / complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent, Fe^{2+} peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700 nm (**Chung et al., 2002**).

En d'autre terme, le système $\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ confère à la méthode la sensibilité pour la détermination « semi-quantitative » des concentrations des polyphénols, qui participent à la réaction rédox (**Amarowicz et al., 2004**).

La **figure 18** représente le pouvoir réducteur de l'acide gallique et la quercétine à différentes concentrations.



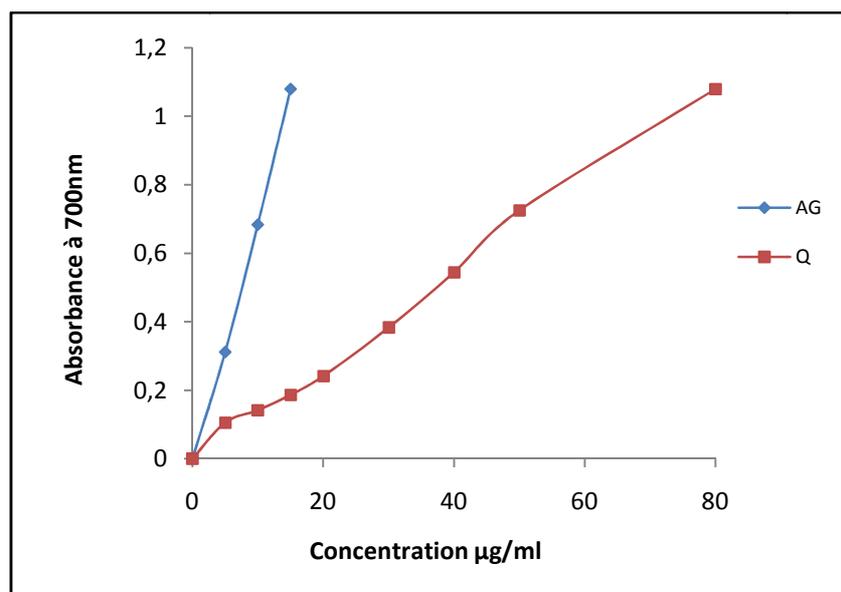


Figure 18 : Pouvoir réducteur des standards testés à différente concentration.

Les études précédentes de la partition des molécules bioactives dans l'extrait montrent que l'utilisation des solvants, avec des polarités différentes dans cette extraction, permet de séparer les flavonoïdes selon leur degré de solubilité et donc selon leur degré de glycosylation (flavonoïdes aglycones, mono, di, tri et tetra-glycosylés).

D'après **Jelena et al. (2008)** et **Ramzi et al. (2008)**, les composés que pourraient contenir les différents extraits préparés seraient comme suit : l'extrait brut peut contenir des flavonoïdes, des aminoacides, des terpènes, et des tannins et toutes molécules à solubilité organique alors que les extraits obtenus suite au fractionnement contiennent des molécules apolaires pour l'extrait chloroformique et des molécules polaires pour l'extrait d'éthyle acétate et n-butanol.



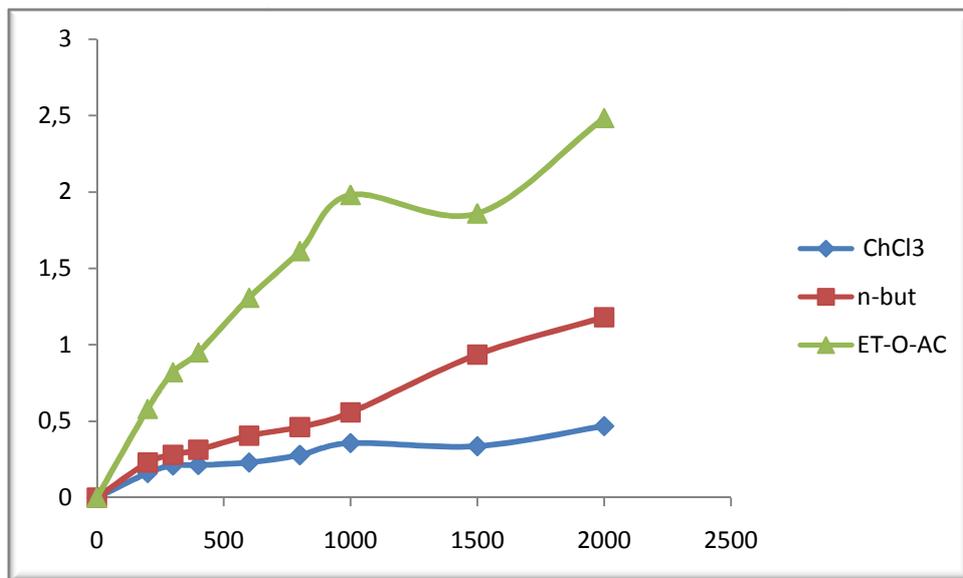


Figure 19 : Pouvoir réducteur des trois extraits à différentes concentrations.

Ces résultats montrent que le pouvoir réducteur des extraits de la plante étudiée (*Euphorbia helioscopia*) et des standards est dose dépendant, c'est-à-dire, il s'élevé avec l'augmentation de la concentration. A la concentration de 1mg/ml l'extrait d'acétate d'éthyle enregistre la plus grande capacité réductrice avec une absorbance de 1.98, suivi des extraits butanolique et chloroformique avec des absorbances égale à 0,557 et 0,357 respectivement. Nos résultats restent aussi supérieurs à ceux trouvés par **Abu Arra Basma et al.(2011)** qui ont enregistré une absorbance de 1.7 à la même concentration de l'extrait méthanolique des feuilles de *E.hirta*.

D'après la **figure 19**, on constate que la fraction acétatique possède une bonne action vis-à-vis de Fe^{3+} présent dans la solution testée suivie de l'extrait butanolique, alors que l'extrait chloroformique n'est actif qu'à partir de la concentration 1mg/ml où il enregistre une augmentation de l'absorbance de 0,337 à 0,468.

Nos différents extraits possèdent une activité réductrice inférieure à celle des standards utilisés. L'ordre de l'efficacité peut être résumé comme suite : Acide gallique > Quercétine > extrait éthyle acétate > extrait butanolique > extrait chloroformique.



Il en est de même pour l'espèce *Euphorbia hirta*, tous les extraits possèdent un pouvoir réducteur inférieur à celui de l'acide ascorbique utilisé comme standard dans ce cas.

Le pouvoir réducteur des deux espèces : *Euphorbia helioscopia* et *Euphorbia hirta* sont probablement dues à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron. Par conséquent, ces molécules peuvent être considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants (**Siddhuraju et Becker, 2007**). Quelques études antérieures ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (**Jeong et al., 2004**).



Conclusion

Conclusion

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Une étude des propriétés antioxydantes a concerné une plante appartenant à la famille des Euphorbiacées, employée en Algérie pour ses propriétés thérapeutiques.

Quantitativement, l'évaluation de la teneur en polyphénols totaux en adoptant la méthode de Folin-Ciocalteu révèle la présence de quantités importantes en polyphénols. De même nous avons dosé les flavonoïdes par la méthode d' AlCl_3 qui nous mène à conclure que cette plante contient une quantité moyennement importante en flavonoïdes par rapports aux composés phénoliques. Il ressort de ces analyses que *E. helioscopia* est riche en polyphénols.

Le potentiel antioxydant des extraits a été déterminé par la méthode de pouvoir réducteur dont les résultats montrent que ces extraits possèdent une bonne activité réductrice, donc cette plante contient des molécules qui sont considérées comme des agents antioxydants de première classe et peuvent être employées pour des applications thérapeutiques, sachant que les antioxydants contribuent de manière très efficace à la prévention des maladies diverses : anti-inflammatoire, anticancéreuse ainsi que les maladies qui touchent le système respiratoire...etc.

Sachant que notre pays possède une biodiversité immense dont chaque plante se caractérise par un réservoir assez important de métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques particulières qui demandent d'être exploitées par la recherche. Comme perspectives on propose de :

- Faire une étude biochimique approfondie sur les fruits d'*Euphorbia helioscopia*.
- Identifier de nouvelles substances bioactives naturelles pourront répondre aux différents problèmes de santé et d'être un alternatif aux médicaments synthétiques.



Annexe

Annexe

❖ Appareils et Produits :

➤ Appareils et instruments :

Tableau V : Appareils et instruments.

Appareils et matériels	Caractéristiques
Agitateur magnétique	
Ampoule à décanter	500 ml
Balance électrique	
Ballons pour le rota-vapeur.	500ml
Broyeur électrique	KIKA Labortechnik
Centrifugeuse	N-6P (Sigma)
Etuve	
Micropipette	1000µl et 20-200µl
Rota vapeur	(Büchi R-134)
Spectrophotomètre	(type Spectronic 20 Genysis TM)

**Image représentant les appareils utilisés**

➤ **Produits :***Tableau VI : Les produits chimiques et les réactifs.*

Produits	Propriétés
Acétate d'éthyle ($\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$)	D=0.902 g/ml
Chloroforme (CHCl_3)	D=1.492 g/ml
Eau distillée	M=18 g/mol
Hexane	D=0.659 g/ml
Methanol ($\text{CH}_3\text{-OH}$)	M=32.04 g/mol
n-Butanol	D=0.808 g/ml
Acide gallique monohydrate ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5\text{H}_2\text{O}$)	M=188.14 g/mol
Carbonate de sodium (Na_2CO_3)	M=105.99 g/mol
Chlorure ferrique FeCl_3	M=162.21 g/mol
Chlorure d'aluminium (AlCl_3)	M=241.43 g/mol
Ferricyanure de Potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	M=329 g/mol
Quercétine	M=302 g/mol
Réactif de Folin-Ciocalteu	
Solution Tampon phosphate	M=0.2 g/mol, ph=6.6
TCA ou acide trichloracétique	M=163.39 g/mol



*Références
bibliographiques*

Références Bibliographiques

Abu Arra Basma, 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*. P : 387-388.

Adamson, J. (2011). *Born Free : The Full Story*. Pan Macmillan ISBN Retrieved. P : 23.

Adjanohoun, E.J., Ahyi, A.M.R., Ake Assi, L., Dan Dieko, L., Daouda, H., Delmar, M., de Souza, S., Garba, M., Guinko, S., Kayanga, A., N’Golo, D., Raynal, J.L. et Saadou, M. (1980). Médecine traditionnelle et Pharmacopée : contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Niger. Agence de Coopération culturelle et technique. Paris. P : 256-260.

Ajibesin, K.K., Ekpo, B.A., Bala, D.N., Essien, E.E., Adesanya, S.A., (2008). Ethno botanical survey of Akwa Ibom State of Nigeria. *Journal of Ethno pharmacology*.(115). 387–408.

Akubue, P.L., Mittal, G.C., Aguwa, C.N. (1983). Preliminary pharmacological study of some Nigerian medicinal plants. *Journal of Ethno pharmacology*. (8). 53-63.

Alonso de Vega, J.M., Diaz, J., Serrano, E., Carbonell, L.F. (2000). Plasma redox status relates to the severity in critically ill patients. *Crit Care Med*. (28). 4-1812.

Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., Weil, J.A. (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry* (84).551–562.

Amella, M., Bronner, C., Briancon, F., et al. (1985). Inhibition of mast cell histamine release by flavonoids and biflavonoids. *Planta Med*. 51 (1).16-20.

Andriambelason, E., Kleschyov, A.L., Muller, B., Beretz, A., Stoclet, J.C., Andriantsitohaina, R. (1997). Nitric oxide production and endothelium dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. *Br J Pharmacol*. (120).8-1053.

Anton, R. (1974). Etude chimiotaxonomique sur le genre *Euphorbia*, thèse de doctorat d'état ES Sciences, Université Louis Pasteur . Strasbourg. P : 184.

Aruoma, O.I., Halliwell, B. (1998). *Molecular Biology of Free Radicals in Human Diseases*. St Lucia: OICA International Press.



Auberville, A. (1959). Flore forestière de la Côte d'Ivoire. Centre Technique Forestier Tropical, Nogent-sur-Marne.

Ayensu, E.S. (1978). *Medicinal Plants of West Africa*. Reference Publications, Algonac, Michigan.

Bahorun, T. (1997). Substances naturelles actives : La flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. *Food. Agric. Res. Council, Réduit, Mauritius*. P : 83-94.

Baillon, M.H. (1874). *Histoires des Plantes*. V. Paris. P : 232.

Baillon, M.H. (1858). Etude générale du groupe des Euphorbiacées. Masson. Paris. P: 20, 222.

Bandyopadhyay, U., Das, D., Banerjee, R.K. (1999). Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Curr Sci.* (77). 658-665.

Bayer, K.P., Buttler, X., Finkenzeller, J., (1998). Guide de la flore méditerranéenne E. Grau – Éditions, Delachaux et Niestlé. P :15.

Bentham, G., Hooker, J.D. (1867). *Genera Plantarum*. I(3). London. P:30.

Benzie, I.F.F., Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma as a measure of antioxidant power the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. (239). 70–76.

Beretz, A., Cazenave, J.P. (1991). Old and new natural products as the source of modern antithrombotic drugs. *Planta Med.* 57 (7).68-72.

Berg, P.A., Daniel, P.T. (1988). Plant Flavonoids in Biology and Medicine II. Progress in Clinical and Biological Research, Cody V, Middleton E, Harborne JB (Eds). Liss AR Inc., New York. (280). 157-171.

Bode, A.M., Cunningham, L., Rose, R.C. (1990). Spontaneous decay of oxidized ascorbic acid (dehydro-L-ascorbic acid) evaluated by high-pressure liquid chromatography. *Clin Chem.* (36). 1807-9.

Boizot, N., and Charpentier, J.P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre fougère. *Le cahier des techniques de l'Inra*. P : 79-82. (cited in Djemai Zoueglache S, 2008).

Boogaerts, M.A., Van, De., Broeck, J., Deckmyn, H., Roelant, C., Vermeylen, J., Verwilghen, R.L. (1984). Protective effect of vitamin E on immune triggered, granulocyte mediated endothelial injury. *Thromb Haemost.* (1).89-92.

Bors, W., Michel, C., Stettmaier, K. (1997). Antioxidant effects of flavonoids Biofactors. (6). 399-402.



Botineau, M. (2010). Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. *Editions Tec et Doc, Lavoisier.* P : 978-2.

Bruneton, J. (1993). Plantes médicinales, pharmacognosie. *Phytochimie, 2^{ème} édition Tec et Doc Lavoisier.* Paris. P : 268-277.

Bruneton, J. (1999). *Phytochimie, plante médicinale, pharmacognosie. 3^{ème} édition* Technique et documentation Lavoisier. P : 783-800.

Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. *Free Radical Biol Med.* (22).746-60.

Carr, A., Frei, B. (1999). Does vitamin C act as pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J.* 13(9).1007-1024.

Chaudhry, P.S., Cabrera, J., Juliani, H.R., et al., (1983). Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethacin. *Biochem Pharmacol.* 32(13). 1995-8.

Cheeseman, K., Slater, T.F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull.* (49).481-493.

Christian, E., Die, L. (2001). Baumartige Wolfsmilch Euphorbia. *Dissertationes Botanicae.* P: 344.

Christopher, B. (2003). Editor-in-chief : RHS A-Z Encyclopedia of Garden Plants. *Third edition.* Dorling Kindersley, London.

Chung, Y.C., Chang, C.T., Chao, W.W., Lin, C.F., Chou, S.T. (2002). Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* (50). 2454–2458.

Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. (2006). *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet.* Edt Blackwell Publishing Ltd.

Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A.A. et al. (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci,* 65 (4).337-53.

Djeridane, A., Yous, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N.(2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.* (97). 654-660.

Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* (82).47-95.



Duraffourd, C., Lapraz, J.C., Chemli, R. (1997). La plante médicinale de la tradition à la science. 1er congrès Intercontinental. Tunis. Ed. Granche. Paris. P: 222.

Elcico-Middleton, Jr., Chithan, K., Theoharis, C. (2000). Effect of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart diseases and cancer. *Pharmacology and Experimental therapeutics*. **4(52)**. 673-751.

Erlund, I. (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology. *NutrRes*. **(24)**. 851-74.

Fernández, M., Caballero, J., Morales Helguera, A., et al. (2005). Quantitative structure-activity relationship to predict differential inhibition of aldose reductase by flavonoid compounds. *Bioorg Med Chem*. **13 (9)**. 3269-77.

Frei, B.B., Ames, B.N. (1998). Relative importance of vitamin E in antiperoxidative defences in human blood and low-density lipoprotein (LDL). In: Packer L, Fuchs J, eds. *Vitamin E in health and diseases*. New York: Marcel Dekker. P : 131-41.

Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z et Jore, D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène, Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité chimique*. P: 91-96.

Gaté, L., Paul, J., Nguyen, Ba.G., Tew, K.D., Tapiérol, H. (1999). Oxidative stress induced in pathologies : the role of antioxidants. **(53)**. 169-80.

Gauche, E., Hausswirth, C. (2006). Stress oxydant, complémentation nutritionnelle en antioxydants et exercice. *Science & Motricité*. **(58)**. 43-66.

Gee, J.M., Johnson, I.T. (2001). Polyphenolic compounds: interactions with the gut and implications for human health, *Curr Med Chem*. **(01-182)**. 8:11.

Gérarde, P., Guy, O. (1965). Études chimio-taxonomiques dans la famille des Euphorbiacées, phytochemistry. Institut de chimie, Strasbourg, France. **(4)**. 799-811.

Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. Laboratoire de Pharmacognosie, Faculté de Pharmacie, rue Avicenne, 5000 Monastir, Tunisie. **(4)**. 162-169.



Gil, B., Sanz, M.J., Ferrándiz, M.C., et al. (1994). Accelerated communication : Effects of flavonoids on *Naja Naja* and human recombinant synovial phospholipases A2 and inflammatory responses in mice. *Life Sci*, **54(20)**.333-338.

Gilani, A. H., Janbaz, K. H., Shah, B.H. (1997). Quercetine xhibitshepa to protective activityin rats. *Biochem Soc Trans*, **25 (4)**.619.

Gomez-Caravaca, A.M., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A. (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. (**41**). 1220-1234.

Gonçalves, J.L.S., Leitão, S.G., Delle Monache, F. (2001). In vitro antiviral effect of flavonoid-rich extracts of *Vitex polygama* (Verbenaceae) against acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1. *Phytomedicine*. **8(6)**.477-80.

Gundidza, M., Sorg, B., Hecker, E.(1993). *J Ethnopharmacol.* (**39**) .209.

Gutteridge, JMC. (1993). Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. Invited review. *Free Radic Res Commun.* (**19**).141–58.

Hale, A.L. (2003). Screening Potato Genotypes for Antioxidant Activity. Identification of the Responsible Compunds, and differentiating Russet Norkotah Strains Using Aflp and Microsatellite Marker Analysis. Office of Graduate Studiea of Texas A&M University Genetics. P: 260.

Halliwell, B. (1993). *DNA and Free Radicals*, Ellis Horwood, Chichester.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1992). Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med.* (**119**): 598-620.

Halliwell, B., Gutteridge, JMC. (1999). In: *Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd ed.* Ox ford, England: Clarendon Press.P:1-139.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford:UniversityPress, (fourthedition).

Hannache, L. (2010). Séminaire Hébdomadaire des Ressources Biologiques.

Harborne, J.B. (1993). *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986.* Chapman & Hall, London.



Havsteen, B.H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *PharmacolTherap.* (96).67-202.

Heal, R.F., Rogers, E.F. (1950). A survey of plants for insecticide al activity. *Lloydia,* (13).89-162.

Hennig, B., Boissonneault, G.A, Wang Y (1989). Protective effects of vitamin E in age-related endothelial cell injury. *Int J VitamNutrRes.* (2).273-9.

Hohmann S. (1997). Yeast Stress Responses. In HohmannS., Mager WH [eds], *Yeast stress responses*, Austin: HRG. Landes Company.

Jacobsen, H. (1981). *Das Sukkulentenlexikon. 2nd edition,* Gustav Fischer Verlag (Stuttgart, New York).

Janero, D.R., Burghards, B. (1989). Oxidative injury to myocardial membrane : direct modulation by endogenous alpha-toco-pherol. *J Mol Cell Cardiol.* (11).111, 1-24.

Jassim, S.A., Naji, M.A. (2003). Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *Appl Microbiol* .95 (3).412-27.

Jelena, K., Visnja, P., Silvana, P., Pavel, M., Ana, C., Dejan, S., Marina, S. (2008). Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts. *Food Chemistry* (107).861-868.

Jeong, S.M., Kim, S.Y., Kim, D.R., Jo, S.C., Nam, K.C., Ahn, D.U., Lee, S.C. (2004). Effects of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.*(52).3389-3393.

John, S., Schmieder, R.E. (2003). Potential mechanisms of impaired endothelial function in arterial hypertension and hypercholesterolemia. *Curr hypertens Rep.* 5(3).199-207.

Kanoun, K. (2011). Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis* L.P:26-29-48-49.

Kerr, M.E., Bender, C.M., Monti, E.J. (1996). An introduction to oxygen free radicals. *Heart Lung.* 25(3). 8-200.

Kim, H.P., Pham, H.T., Ziboh, V.A. (2001). Flavonoids differentially inhibit guinea pig epidermal cytosolic phospholipase A2. *Prostag, LeukotrEss Fatty Acids,* 65(5-6): 281-6.

Koes, R.E., Quattrocchio, F. and Mol, J.N.M. (1994). The flavonoid biosynthetic pathway in plants function and evolution. *BioEssays.*(16).123–132.



Kohen, R., Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems. Oxidative stress and antioxidants. *Toxicolopathol.* (30).620-630.

Kontos, H. (2001). Oxygen radicals in cerebral ischemia. The Willis lecture. *Stroke.* (32). 2712-2716.

Kotani, M., Matsumoto, M., Fujita, A., et al. (2000). Persimmon leaf extract and a stragalin inhibit development of dermatitis and IgE elevation in NC/Ngamice. *J Aller Clin Immunol.* 106 (1).159-66.

Laguette, M., Lecomte, J. and Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipidoxidation : Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research.* (46).244-282.

Lahouel, M., Amedah, S., Zellagui, A., Touil, A., Rhouati, S., Benayache, F., Leghouchi, E. et Bousseboua, H. (2006). The interaction of new plant flavonoids with rat liver mitochondria: relation between the anti and prooxidant effect and flavonoids concentration. *Thérapie.* 61(4).347-355.

Lehucher-Michel, M.P., Lesgards, J.F., Delubac, O., Stocker, P., Durand, P., Prost, M. (2001). Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale.* (30).1076-1081.

Lhuillier, A. (2007). Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches *Agauriasalicifoliahook*, *Fexoliver*, *Agauriapolyphliabaker* (ERICACEAE), *Tambourissatrichophyllabaker* (MONIMIACEAE) et *Embeliaconcinnabaker* (MYRSINACEAE). P: 20-28-152-153.

Lugasi, A., Hóvári, J., Sági, K.V. et Bíró, L. (2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis.* 47(1-4). 119-125.

Mahantesh, S.P., Gangawane, A.K., Patil, C.S. (2012). Free radicals , Antioxidants Diseases and phytomedicines in human health: future prospects. *World Research Journal of Medicinal & Aromatic Plants.* (1).06-10.

Makoi, J.H.J.R., Ndakidemi, P.A. (2007). Biological, ecological and agronomic significance of plant phenolic compounds in rhizosphere of the symbiotic legumes. *African Journal of Biotechnology.* 6(12).1358-1368.

Marfak, A. (2011). Radiolyse gamma des flavonoides. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation des depsides.



Martin, S., Andriambelason, R. (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium .Cellular mechanism of vasculo-protection induced by polyphenols on the endothelium *Annales de cardiologie et d'angéiologie.* (51). 304–315.

Martínez-Cayuela, M. (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie.* (77).147-161.

Mazza, G. (1995). Anthocyanins in grapes and grape products. *Crit Rev Food Sci Nutr.* (35). 341–71.

Médart, J. (2009). Manuel pratique de nutrition : L'alimentation préventive et curative. 2^{ème} édition, Editions De Boeck Université, Bruxelles. P: 2-51.

Medić-Šarić, M., Jasprica, I., Smolčić-Bubalo, A. et Mornar, A. (2004). Optimization of Chromatographic Conditions in Thin Layer Chromatography of Flavonoids and Phenolic Acids. *Croatica Chemica Acta.* 77 (1-2). 361-366.

Ménana, H. (2010). Dégradation de dérivés de l'acide benzoïque par les procédés d'oxydation avancée en phase homogène et hétérogène : procédés Fenton, photo-Fenton et photocatalyse. Thèse en vue de l'obtention de doctorat de l'université de Toulouse, *Laboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivité chimique et Photochimique.* P: 29.

Mette, M., Berger, (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances Nutritional manipulation of oxidative stress: review of the evidence *Nutrition clinique et métabolisme.* (20).48–53.

Middleton, E. et al., (2000). The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev.* 52(4).673-751.

Miller, A.L. (1996). Antioxidant Flavonoids : Structure, Function and Clinical Usage. *Alt Med Rev* 1996. 1 (2).103-11.

Mira, L., Fernandez, M.T., Santos, M., Rocha, R., Florencio, M.H., Jennings, K.R. (2002). Interactions of flavonoids with iron and copper ions a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic Res.* (36). 1199-208.

Naidu, K.A. (2003). Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutrition Journal.* (2).P:7.

Nakai, N., Fujii, Y., Kobashi, K., et al.(1985). Aldose reductase inhibitors flavonoids, alkaloids, acetophenones, benzophenones, and spirohydantoin of chroman. *Arch Biochem Bioph.* 239 (2).491-6.



Oliver-Bever, B. (1983). Medicinal Plants in Tropical West Africa. III. Anti-Infection Therapy with Higher Plants. *Journal of ethno pharmacology*. (9).1–83.

Oshimic, N., Chance, B., Sies, H., et al. (1973). The role of H₂O₂ generation in perfused rat liver and the reaction of catalase compound I and hydrogen donors. *Arch Biochem Biophys*. (154).117-122.

Paris M. (1981). Abrégé de matière médicale (pharmacognosie généralités monographie 1^{ère} partie), plantes à glucides (holosides, hétérosides), à lipides, à huiles essentielles, à protides et à alcaloïdes. Masson, Tome 1, Paris. P: 339.

Passwater, R.A. (1997). The Antioxidants, Ed: EATS GOOD HEALTH GUIDE. P: 7-11.

Pierpoint, W.S. (2000). Why do plants make medicines. *Biochemist*. P: 22, 37–40.

Poljsak, B. (2011). Skin aging, free radicals and antioxidants. New York: *NovaSciencePublisher*.

Ragasa, Consolacion Y., and Kimberly B. Cornelio. (2013). Triterpenes from *Euphorbia Hirta* and Their Cytotoxicity. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 11(5): 528–33.

Ramzi, A. A., Mothana1, Salah, A. A., Abdo, S. H., Faisal, M. N., Althawab, Sama, A. Z., Alaghbari, and Ulrike, L. (2008). Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activities and Phytochemical Screening of Some Yemeni Medicinal Plants. *CAM Advance Access* published January. (28). 2-6.

Ratsimiala, R.I.M., Ramananjanahary, R.H. (2005). Etudes ethnobotanique, biologique etécologique de quelques plantes anti-diarrhéiques de la région nord-ouest de Madagascar *thnopharmacologia*. (36).51.

Ray, G., Husain, S.K. (2002). Oxidants, antioxidants and carcino genesis. *Ind. J. Experim. Biol.* (40). 1213-1232.

Reginald, H.G., Charles, M.G. (2000). *Biochimie, De Boeck supérieur, Paris*. P :599.

Reth, M., Wienands, J. (1997). Initiation and processing of signals from the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol*. (15).453-79.

Roussel, A.M. (2009). Qui manque d'antioxydants, et comment le savoir ? *Cahiers de nutrition et de diététique*. P: 7.

Schmidt, R.J., Evans, F.J. (1980). Contact Dermatitis. (6).204.



- Serkedjjeva, J., Ivancheva, S. (1998).** Antiherpes virus activity of extracts from the medicinal plant *Geranium sanguineum* L. J Ethno pharmacol. **64 (1)**.59-68.
- Sharma, Veena, and PrachetaJanmeda. (2014).** Extraction, Isolation and Identification of Flavonoid from Euphorbia Neriifolia Leaves. Arabian Journal of Chemistry
- Shi, Y.P., Jia, Z.J.(1997).** New progress about chemistry and biological activity of diterpenoids from genus Euphorbia in China. Chem J Chin Univ.(7).1107–12.
- Shi, Q.W., Su, X.H., Kiyota, H.(2008).** Chemical and pharmacological research of the plants in genus Euphorbia. Chem Rev. (**108**).4295–327.
- Siddhuraju, P., Becke,r K. (2007).**The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. Food Chemistry.**101(1)**.10-19.
- Silva, A.C.P., Faria, D.E.P.D., Borges, N.B.D.E.S., Souza, I.A.D., Peters, V.M., & Guerra, M.D.O. (2007).** Toxicological screening of *Euphorbia tirucalli* L. Developmental toxicity studies in rats. Journal of Ethno pharmacology.(**110**).154–159.
- Singh, Meena. (1994).** Succulent Euphorbiaceae of India. Mrs. Meena Singh, A-162 Sector 40, NOIDA, New Delhi, India.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., and Lamuela-Raventos, R. M. (1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method.Enzymol.* (**299**).152-178.
- Slater, T.F. (1985).** Free radical mechanism in tissue injury. *Biochem Journal.* (**222**). 1-15.
- Sorg, O. (2004).** Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. Comptes Rendus Biologies. (**327**). 649-662.
- Svoboda, K.P., Hampson, J.B. (1999).** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants : antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department. SAC Auchincruive. Ayr. Scotland.P:156-160.
- Tache, S. (2000).** Speciile reactive ale oxigenului si azotului:formare siconsecin;e. In Dejica D (*ed.*). Stresuloxidativînbolile interne. CasaCartii de stiinta, Cluj-Napoca. P: 15-76.
- Tandon, V., Gupta, B.M., Tandon, R. (2005).** Free radicals/Reactive oxygen species. JK-Practitioner.(**12**).143-148.



Valenzuela, A., Guerra, R. (1985). Protective effect of the flavonoids ilybin dihemisuccinate on the toxicity of phenylhydrazine on rat liver. *FEBS Letters*. **181** (2):291-4.

Vertuani, S., Angusti, A. and Manfredini, S. (2004). The Antioxidants and Pro-Antioxidants Network: An Overview. *Department of Pharmaceutical Science, University of Ferrara, Ferrara, Italy.* (10).1677-1694.

Villar, A., Gasco, M.A., Alcaraz, M.J. (1987). Some aspects of the inhibitory activity of hypolaetin-8-glucoside in acute inflammation. *J Pharm Pharmacol.* **39** (7).502-7.

Walter, H., Lieth, H. (1960-1967). *Klimadiagramm-Weltatlas.* -lena.

Warner, D.S., Sheng, H., Batini-Haberle, I. (2004). Oxidants, antioxidants, and the ischemic brain. *J Exp Biol.* (207). 3221-3231.

Willcox, J.K, Ash, S.L., Catignan, G.L. (2004). Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutri.* (44).275-95.

Wollny, T., Aiello, L., Di Tommaso, D., Bellavia, V., Rotilio, D., Donati, M.B., et al. (1999). Modulation of haemostatic function and prevention of experimental thrombosis by red wine in rats: a role for increased nitric oxide production. *Br J Pharmacol.* (127).55-747.

Yamamura, S., Ozawa, K., Ohtani, K., et al. (1998). Antihistaminic flavones and aliphatic glycosides from *Mentha spicata*. *Phytochemistry*. **48** (1) 131-6.

Young, I., Woodside, J. (2001). Antioxidants in health and disease *J. Clin Path.* (54).176 86.

Zarei, Seyed Mohammad *et al.* (2013). Unusual Ingenoids from *Euphorbia Erythradenia* Bioss. With pro-Apoptotic Effects. *Fitoterapia.* (91).87–94.



Résumé

Résumé :

Les polyphénols sont des métabolites secondaires dotés d'une large gamme d'activités biologiques à savoir une activité antimalariale, une régulation du fonctionnement hépatobiliaire, un effet antioxydant, des activités anticancéreuses, anti-inflammatoires...etc. Dans notre travail nous nous sommes intéressés d'une part à l'extraction des substances bioactives d'une plante médicinale de la famille des euphorbiacées réputée pour sa richesse en composés phénolique et utilisé en médecine traditionnelle pour ces vertus thérapeutiques et d'autre part à l'évaluation de l'activité antioxydante des différents extraits par le test du pouvoir réducteur. Cette étude a montré que l'extrait éthyle acétate possède la meilleure capacité réductrice avec une absorbance de 2.483 à la concentration de 2 mg/ml et avec une teneur en composés phénolique s'élevant à 51.40 mg EAG/ g d'extrait, suivi de l'extrait butanolique et chloroformique qui enregistrent des absorbances de 1.180 et 0.468 respectivement à la même concentration.

Mots clés: Extraction, *Euphorbiacées*, Composés phénoliques, Flavonoïdes, Pouvoir réducteur, Antioxydant.

Abstract :

Polyphenols are secondary metabolites with a wide range of biological activity, see antimalarial activity, regulation of hepatobiliary operation, an antioxidant, anticancer, anti-inflammatory....etc. In our work we focused on one hand the extraction of bioactive substances of a medicinal plant of the family Euphorbiaceae known for it rich in phenolics compounds and used in traditional medicine for the therapeutic and also to evaluation of the antioxidant activity of various extracts by the test for the reducing power, this study showed that the ethyl acetate extract has the best reducing ability with an absorbance of 2.483 at a concentration of 2 mg/ml and with phenolics compounds content which reaches a rate of 51.40 mg EAG/g extract, followed by chloroform and butanol extract which record absorbance of 1.180 and 0.468 respectively at the same concentration.

Mots clés: Extraction, *Spurge*, Phenolics Compounds, Flavonoids, Reducing power, Antioxidant

ملخص

تتميز مركبات عديدة الفينول بنشاط بيولوجي واسع، يتمثل أساسا في قدرتها على تنظيم الوظائف الكبدية-الصفراوية وعملها كمضادات للعديد من الأمراض كالمالاريا، الأكسدة، السرطان والالتهابات ... الخ. في عملنا هذا تم التركيز على استخلاص المواد النشطة بيولوجيا من نبات طبي ينتمي لعائلة الفربيون لغناه بالمركبات الفينولية وتستخدم في الطب التقليدي لخصائصها العلاجية. قمنا أيضا بتقييم النشاط المضاد للأكسدة لمستخلصاتها المختلفة عن طريق اختبار قوة الحد حيث أظهرت النتائج أن مستخلص خلاص الإيثيل لديه أفضل قدرة حدية (إرجاعية) بلغت 2.483 عند تركيز 2 ملغ / مل و محتوى من المركبات الفينولية قدرت بـ 51.40 ملغ EAG/ غ من المستخلص، بينما أظهر كل من المستخلصين البيوتانولي و الكلوروفورمي قدرة حد ضعيفة بامتصاصية 1.180 و 0.468 على التوالي في نفس التركيز.

كلمات مفتاحية: الاستخلاص، الفربيون، المركبات الفينولية، الفلافونويدات، قوة الحد، مضاد الأكسدة.

