



**HAL**  
open science

## Valorisation des activités biologiques de certaines espèces végétales sahariennes nord-africaines

Ionut-Florin Palici

► **To cite this version:**

Ionut-Florin Palici. Valorisation des activités biologiques de certaines espèces végétales sahariennes nord-africaines. Biologie végétale. Université de Bordeaux, 2016. Français. NNT : 2016BORD0321 . tel-01515319

**HAL Id: tel-01515319**

**<https://theses.hal.science/tel-01515319>**

Submitted on 27 Apr 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**Ecole Doctorale Sciences de l'Environnement**

**Thèse de Doctorat**  
**en Sciences Agronomiques, Biotechnologies Agro-**  
**alimentaires**

**Présentée par**

**Ionut-Florin Palici**

*Docteur en Pharmacie, Assistant en Botanique*  
*Université de Médecine & de Pharmacie de Timisoara, Roumanie*

**Titre**

**Valorisation des Activités biologiques de**  
**certaines espèces végétales sahariennes**  
**Nord-africaines**

**Soutenue publiquement le 30 Novembre 2016, devant le jury :**

**Pierre Waffo-Téguo, Pr. Université de Bordeaux; Président**  
**Bernard Amiaud, Pr. Université de Lorraine; Rapporteur**  
**Jean-Christophe Clément, Pr. Université Savoie Mont-Blanc; Rapporteur**  
**Blaise Touzard, M. de Conf. ; HDR, Université de Bordeaux; Directeur**  
**Mohamed Chaieb, Prof., Université de Sfax, Tunisie; Membre**

**Année Universitaire : 2015-2016**

## Résumé

La région saharienne est une des zones les plus défavorables à la croissance et développement des espèces animales. Cependant, peu d'espèces possèdent à la fois des mécanismes morphologiques et écophysiologiques, assurant leur survie dans les sols arides et sur les dunes de sable.

En effet, on peut estimer que le métabolisme secondaire biosynthétise des quantités considérables de composés bioactifs, destinés à assurer le développement et la continuité de ces espèces, notamment leur survie dans ces conditions sahariennes précaires.

Les propriétés pharmacologiques des extraits de plantes sahariennes peuvent apporter des bénéfices dans la guérison de certaines maladies microbiennes ou prolifératives ou également contribuer au développement de certaines activités antioxydantes.

L'étude des propriétés toxiques vise donc à enrichir la connaissance du potentiel bioactif des plantes sahariennes.

Ces aspects de la puissance du métabolisme furent étudiés chez certaines espèces végétales strictement sahariennes. Il s'agit de : *Anthyllis henoniana* Coss., *Centropodia forskalii* (Vahl) Cope, *Cornulaca monacantha* Delile, *Ephedra alata* var. *alenda* (Stapf.) Trabut, *Euphorbia guyoniana* Boiss & Reut., *Henophyton deserti* Coss. & Durieu, *Hélianthemum confertum* Dunal, *Molkiopsis ciliata* (Forssk.) I.M. Johnst. et *Spartidium saharae* (Coss. & Durieu) Pomel.

Les principaux résultats obtenus montrent que ces espèces possèdent des propriétés intéressantes, susceptibles d'être utiles pour le traitement de certaines maladies humaines. En revanche, parfois à certaines concentrations, des extraits de ces espèces peuvent présenter des effets toxiques sur les organismes.

En dépit des conditions extrêmes, le Sahara représente la zone de développement d'une certaine diversité biologique, et principalement des espèces de plantes précieuses dont dont une meilleure connaissance scientifique de leur propriétés phytochimiques se révèle indispensable.

Mots clés: *plantes sahariennes, activités biologiques, activité antitumorale, effet toxique, stress antioxydant, Afrique du Nord.*

## Abstract

The Saharan desert is one of the most unfavorable areas, to the plant life. However, a small number of plants possesses both morphological and ecophysiological mechanisms ensuring their survival in the arid soil and on the sand dunes.

It can be estimated that the secondary metabolism biosynthesizes considerable amounts of bioactive compounds, meant to ensure the development and the continuity of these species.

The pharmacological properties of saharan plant extracts may bring benefits in the healing of certain microbial or proliferative diseases or contributes to the supply of antioxidants activities.

The study of toxic properties is meant to enrich the knowledge of Saharan plants' bioactive potential.

The biological activities of *Anthyllis henoniana* Coss., *Centropodia forskalii* (Vahl) Cope, *Cornulaca monacantha* Delile, *Ephedra alata* var. *alenda* (Stapf.) Trabut, *Euphorbia guyoniana* Boiss & Reut., *Henophyton deserti* Coss. & Durieu, *Helianthemum confertum* Dunal, *Moltkiopsis ciliata* (Forsk.) I.M.Johnst. and *Spartidium saharae* (Coss. & Durieu) Pomel have been studied. It can be seen that these species possess interesting properties, capitalized in the treatment of some human diseases. But, on the other hand in certain concentrations, extracts from these species may exhibit toxic effects on organisms.

Despite the extreme conditions, the Saharan desert represents the area of development for some valuable plant species, whose scientific knowledge is necessary.

Key words : *saharan plants*, *Biological activities*, *antitumoal activity*, *toxic effect*, *stree antioxydant*, *North Africa*.

## Sommaire

PARTIE I : L'ENVIRONNEMENT SAHARIEN & INTERÊT PHARMACOLOGIQUE DES ESPÈCES VÉGÉTALES .....	12
CHAPITRE I : BREF RAPPEL SUR LA VEGETATION NATURELLE & SON MILIEU EN ZONE SAHARIENNE TUNISIENNE .....	13
<b>1. Généralités sur la zone saharienne</b> .....	13
<b>2. Le milieu saharien en Tunisie</b> .....	14
2.1. Climat.....	15
2.2. Couverture Pédologique.....	16
2.3. Paysage Naturel.....	17
2.4. La couverture géologique.....	21
2.5. Conclusion .....	24
CHAPITRE II: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES INTERÊTS PHARMACOLOGIQUES & BIOLOGIQUES DES ESPÈCES VEGETALES .....	25
<b>1. Introduction</b> .....	25
<b>2. Rappel sur les métabolites secondaires des végétaux</b> .....	26
<b>3. Rappel sur les perturbations métaboliques liées au stress</b> .....	30
3.1. Stress oxydatif :.....	30
3.2. Infections bactériennes et antibiothérapie.....	31
3.3. Rappel des principes de la toxicologie.....	32
3.4. Activité anticancéreuse des substances naturelles .....	35
PARTIE II : MATÉRIEL VÉGÉTAL ÉTUDIÉ & APPROCHE METHODOLOGIQUE ADOPTÉE .....	36
CHAPITRE I : BOTANIQUE & ECOLOGIE DES ESPÈCES RETENUES .....	37
<b>1. Introduction</b> .....	37
<b>2. Index synonymique des espèces étudiées</b> .....	38
<b>3. Caractéristiques botaniques et classification systématique des espèces étudiées</b> ....	40
3.1. <i>Anthyllis henoniana</i> Coss. ....	40
3.2. <i>Centropodia forsskaolii</i> .....	42
3.3. <i>Cornulaca monacantha</i> .....	44
3.4. <i>Ephedra alata</i> subsp. <i>alenda</i> (Stapf) Batt. & Trab.....	45
3.5. <i>Euphorbia guyoniana</i> Boiss. & Reut .....	47
3.6. <i>Helianthemum confertum</i> Dunal.....	50
3.7. <i>Henophyton deserti</i> Coss. & Durieu .....	51
3.8. <i>Motkiopsis ciliate</i> (Forssk.) I. M. Johnston.....	53

3.9. <i>Spartidium saharae</i> (Coss.) Pomel .....	55
CHAPITRE II : PHYTOCHIMIE & ACTIVITÉ BIOLOGIQUE .....	57
<b>1. Introduction</b> .....	57
<b>2. Valorisation et intérêt biologique des espèces étudiées</b> .....	58
2.1. <i>Anthyllis henoniana</i> .....	58
2.2. <i>Centropodia forskalii</i> .....	59
2.3. <i>Cornulaca monocantha</i> .....	59
2.4. <i>Ephedra alata-alenda</i> .....	59
2.5. <i>Euphorbia guyoniana</i> .....	60
2.6. <i>Helianthemum confertum</i> : .....	61
2.7. <i>Henophyton deserti</i> : .....	61
2.8. <i>Moltkiopsis ciliata</i> : .....	62
2.9. <i>Spartidium saharae</i> : .....	62
<b>3. Conclusions</b> .....	63
CHAPITRE III : MÉTHODOLOGIE & EXPÉRIMENTATIONS REALISÉES .....	64
<b>1. Collecte du matériel végétal</b> .....	64
1.1.Sites de collecte : Climat et géographie .....	64
1.2.Collecte et préparation des échantillons végétaux .....	71
<b>2.Expérimentations réalisées</b> .....	71
2.1. Essais anticancéreux et antimicrobiens .....	71
2.2. Etude de l'activité antibactérienne: .....	72
2.3. Essais de toxicité .....	74
2.4. Essais antioxydants .....	76
PARTIE III : RÉSULTATS OBTENUS DISCUSSIONS & CONCLUSION GENERALE..	78
CHAPITRE I : STUDY OF <i>IN VITRO</i> ANTIMICROBIAL AND ANTIPROLIFERATIVE	
ACTIVITIES OF SELECTED SAHARAN PLANTS .....	79
CHAPITRE II : Preliminary toxicity of some extracts from Saharan plants species .....	93
<b>Preliminary toxicity of some extracts from Saharan plants species</b> .....	93
<b>Abstract</b> .....	94
<b>I. Introduction</b> .....	95
<b>II. Material and Methods</b> .....	96
1. Site of collection of plants .....	96
2. Plant Material.....	97
3. Extraction method .....	99
<b>Results</b> .....	101
<b>Discussion</b> .....	108
<b>Conclusion</b> .....	110

<b>Acknowledgment :</b> .....	111
<b>References</b> .....	111
<b>Tables list:</b> .....	114
<b>Figures list:</b> .....	114
<b>CHAPITRE III : Antioxidant activity of some Saharan plant species</b> .....	116
<b>Abstract</b> .....	116
<b>1.Introduction</b> .....	117
<b>2.Material and Methods</b> .....	119
<b>3.Results and Discussions</b> .....	120
<b>4.Conclusions</b> .....	125
<b>References</b> .....	126
<b>CHAPITRE IV : DISCUSSION GENERALE, COLCLUSIONS &amp; PERSPECTIVES</b> .....	129
<b>1.DISCUSSION GENERALE</b> .....	129
1.1.Evaluation de l'activité antibactérienne et anticancéreuse des espèces étudiées.....	129
1.2.Evaluation de l'activité toxique des espèces étudiées.....	131
1.3.Activité anti-oxydante des espèces retenues .....	132
<b>2.CONCLUSION GENERALE</b> .....	133
<b>3.PERSPECTIVES</b> .....	135
<b>Références bibliographiques</b> .....	136

## LISTE DES FIGURES TABLEAUX ET PLANCHES

### PARTIE I & PARTIE II

#### Liste des figures

**Figure 1 :** Carte bioclimatique de la Tunisie saharienne et présaharienne (Gounot et Le Houérou, 1988) ; Echelle 1/10<sup>6</sup>

**Figure 2.** Les régions naturelles du sud de la Tunisie (Le Houérou, 1959).

**Figure 3 :** Carte géologique du Sud Tunisie, (Le Houérou, 1969). Echelle 1/5 10<sup>6</sup>

**Figure 4:** Les différents organes cibles du stress oxydatif (Ali & al, 2008)

**Figure 5 :** Localisation géographique de la région saharienne de collecte des espèces végétales (cercle rouge). 1 : site de Nefta ; 2 : site de Hazwa ; 3 : site d'El Fawar ; 4 : site de Bir Soltane.

**Figure 6.** Concentration de l'échantillon par rapport à E

#### Liste des Tableaux

**Tableau 1 :** Relation entre la nature des biomolécules chez certaines espèces végétales sahariennes nord-africaines et leurs activités biologiques.

**Tableau 2:** Nomenclature en vigueur et Index synonymique des espèces étudiées

**Tableau 3:** Résumé des caractéristiques biologiques et écologiques des espèces étudiées

**Tableau 4 :** Liste des espèces végétales et types d'organes criblés dans cette étude.

**Tableau 5 :** Les quantités d'extraits secs et de la valeur de l'E pour les espèces étudiées

#### Liste des Planches

**Planche 1 :** Détail d'un individu d'*Anthyllis henoniana* en fleurs (A), rameau fleuri (B) et détail de la fleur (C).

**Planche 2:** Individu de *Centropodia forsskaoli* (A) , avec tiges décombantes, epis formée (B)

**Planche 3 :** Port de *Cornulaca monacantha* (A), rameau feuillé (B) et fleur (C).

**Planche 4:** Port général d'*Ephedra alata - alenda* (Stapf) Batt. & Trab ; rameau fleurit (B) et fleur en épanouissement (C).

**Planche 5:** *Euphorbia guyoniana*: Port de l'espèce (A), tige fleurie (B), détail d'une fleur (C).

**Planche 6 :** Rameaux feuilles et fleurs d'*Helianthemum confertum*

**Planche 7:** *Henophytno deserti*, Port de l'espèce (A), Rameau feuillé (B), et fleur (C).

**Planche 8 :** Individu de *Poltkiopsis ciliata* (A), rameau fleuri (B) et détail des fleurs (C).

**Planche 9 :** *Spartidium saharae* (Individu & rameau fleurit).

**Planche 10 :** Paysage caractéristique du site de Nefta.

**Planche 11 :** Paysage caractéristique du site de Hazwa.

**Planche 12:** Morphologie du paysage du site d'El fawar

**Planche 13 :** Géomorphologie du site de Bir soltane. (Individus d'*Euphorbia guyoniana*, en plein développement durant la saison printanière.

### **PARTIE III**

#### **1. CHAPITRE I**

##### **Liste des Tableaux**

**Table 1:** List of plants screened in this study

**Table 2:** Antibacterial activity of the investigated plants in disc-diffusion method

**Table 3:** MIC values of investigated plant extracts

**Table 4:** Antiproliferative properties of the effective plant extracts

#### **2. CHAPITRE II**

##### **Liste des Figures**

**Figure 1.** Sample concentration in relation to E.

**Figure 2.** Viability of shrimps larvae in extract of *Ephedra alata alenda*.

**Figure 3.** Viability of shrimps larvae in extract of *Euphorbia guyoniana*.

**Figure 4.** Viability of shrimps larvae in extract of *Helianthemum confertum* (underground part).

**Figure 5.** Viability of shrimps larvae in extract of *Anthyllis henoniana*.

**Figure 6.** Viability of shrimps larvae in extract of *Centropodia forsskaolii*.

**Figure 7.** Viability of shrimps larvae in extract of *Henophyton deserti*.

**Figure 8.** Viability of shrimps larvae in extract of *Spartidium saharae*.

##### **Liste des Tableaux**

**Table 1.** Summary of biologicals and ecologicals characteristics of the studied species

**Table 2.** Quantities of dry extracts and value of E for studied species.

## Remerciements

Avant de présenter ce travail, je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement Monsieur Blaise Touzard, M.C. Habilité à l'Université de Bordeaux, pour son aide à mon inscription à Bordeaux, ainsi qu'à son aide matérielle fournie pour mon déplacement à Marseille, en vue du travail aux Laboratoires d'AMU. Egalement je le remercie pour son soutien et ses conseils scientifiques précieux.

Monsieur Mohamed CHAIEB, Professeur de botanique et d'écologie végétale à la Faculté des Sciences de Sfax, Tunisie, étant à l'origine de l'idée de mon inscription en Thèse en France, a bien voulu planifier toutes les étapes de la thèse, depuis la programmation de la campagne de collecte des plantes au Sahara de la Tunisie jusqu'à la correction du mémoire. Je le remercie pour son aide permanente, ses conseils précieux et ses qualités humaines et scientifiques.

Je ne peux bien entendu pas oublier mes membres du jury, qui ont bien voulu accepter de lire mon mémoire et juger mon travail. Il s'agit de Monsieur Pierre Waffo-Tégou, Professeur à l'Université de Bordeaux, en tant que Président du jury ; Monsieur Bernard Amiaud, Professeur à l'Université de Lorraine en tant que Rapporteur et Jean-Christophe Clément, Professeur à l'Université Savoie Mont-Blanc, également en tant que Rapporteur.

Madame Véronique Masotti, M.C à l'IMBE Marseille, a bien voulu me recevoir dans son Laboratoire durant 1 mois pour effectuer les extractions de mes plantes. Je la remercie pour son aide précieuse, ses conseils et son savoir scientifique.

Madame Judit Hohmann, Doyenne de la Faculté de Pharmacie de Szeged, Hongrie, m'a reçu plusieurs fois dans son Laboratoire de Pharmacognosie. Je la remercie, ainsi que toute son équipe, pour leur aide, leur soutien et leurs qualités scientifiques et humaines.

Madame Evelyne Ollivier, Professeur à la Faculté de Pharmacie d'Aix-Marseille Université, m'a reçu dans son Laboratoire de Pharmacognosie à Marseille. Je la remercie, ainsi que son équipe, notamment Mme Béatrice Baghdikian et Mr Fethi Mabrouki pour leur aide à l'extraction des plantes. Leurs qualités humaines m'ont permis de bien intégrer leur équipe.

Enfin, je ne peux oublier ma femme Iby et mes enfants Alex, Luca et Matei, pour leur patience durant tout ce travail de thèse, et leur patience vis-à-vis de mes absences répétées de la maison.

Merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire. Je cite particulièrement Zoltan Szabadai, Dan Dragos et Adrian Grozav.

## **Introduction Générale et Objectifs de l'étude**

Les régions sahariennes constituent des vastes étendues géographiques occupant une bonne partie du globe terrestre. Elles sont réputées par leur faible biodiversité, et leurs difficiles conditions pour la vie humaine. En outre, au niveau du globe terrestre, les déserts peuvent être froids (déserts de l'Asie centrale) ou chauds (continents africain, asiatique, et américain), ce qui crée des conditions difficiles d'installation des êtres vivants (animaux et végétaux).

En zones sahariennes, la végétation des zones arides, en particulier est très clairsemée, à aspect en général nu et désolé. Les arbres sont aussi rares que dispersés et les herbes n'y apparaissent que pendant une période très brève de l'année, quand les conditions deviennent favorables (Schiffers, 1971). De même, les espèces végétales désertiques vivent généralement en conditions climatiques draconiennes et par conséquent, elles possèdent un système d'adaptation très particulier aux conditions environnementales sahariennes (Le Houérou 1969). Parmi les caractéristiques adaptatives de ces espèces, on cite les modifications morphologiques, anatomiques et physiologiques qui font que ces taxons peuvent survivre dans ces milieux. A juste titre, Albouchi et al. (2001), ont montré que les espèces désertiques possèdent des caractéristiques morphologiques, anatomiques, physiologiques et biochimiques qui leur permettent d'accomplir normalement le cycle de vie, même en absence de précipitations.

D'après Le Houérou (1990), la zone désertique tunisienne est caractérisée par d'importantes variations pluvio-thermiques, qui engendrent des conditions, notamment de stress hydrique très contraignantes. En dépit de ces contraintes climatiques, ces régions sont souvent largement marquées, par une forte empreinte de l'activité anthropique, qui se manifeste soit par des actions de déboisement ou de surpâturage. Ce processus de dégradation, étant le plus souvent irréversible, oblige les aménagistes à recourir à des procédés et des techniques de restauration artificielle de la diversité végétale. Toutefois, dans un objectif de maintien de la biodiversité locale, les scientifiques suggèrent le recours plutôt à l'introduction des espèces autochtones (Chaieb, 1989), dont les capacités adaptatives ne font aucun défaut (Le Houérou, 2000).

Par ailleurs, les espèces végétales ont toujours été indispensables tant pour l'alimentation, les soins de santé, la construction que pour la purification de l'air et de l'eau. L'ensemble des services rendus par la biodiversité végétale en font un élément essentiel pour l'humanité. Cela est particulièrement vrai pour les plantes médicinales qui sont largement utilisées par les

humains. Elles constituent ainsi une richesse culturelle et naturelle propre à chacune des communautés et aux territoires qu'elles occupent. Ce constat est d'autant plus vrai qu'on soit en régions à climat précaire, comme au Sahara par exemple. Dans ce contexte, la valorisation des la flore saharienne, a toujours constitué un centre d'intérêt pour les populations locales. En effet, plusieurs espèces végétales constituent une source de nourriture pour les habitants des régions sahariennes. Ainsi, en plus des dattes qui constituent la principale source d'hydrates de carbones pour les populations sahariennes, d'autres espèces comme par exemple *Panicum turgidum*, *Poaceae* pérenne, sont très valorisées pour les graines par la consommation alimentaire humaines, notamment en cas de disettes.

Au Sahara, la médecine traditionnelle assurait la majeure partie de la couverture des besoins sanitaires des populations pendant la période précoloniale en l'absence de la médecine moderne. Cette situation a perduré jusqu'à la colonisation, période pendant laquelle la médecine traditionnelle a été proscrite au profit de la médecine moderne importée. Ainsi, en plus de l'utilisation alimentaire, les espèces végétales sahariennes furent couramment valorisées depuis l'antiquité pour leurs vertus thérapeutiques. Ainsi, d'après Ozenda (1983), les ressources végétales spontanées du Sahara constituent une flore d'environ 500 espèces de plantes supérieures, dont une bonne partie est de nos jours utilisée par les populations comme plantes médicinales.

Au niveau scientifique, Il est à signaler que la majorité des études relatives a la flore et végétation saharienne, ont porté pour l'essentiel sur les aspects botaniques, physiologiques et écologiques et biogéographiques (Le Houérou, 1959, 1969, Floret & Pontanier 1982, Ozenda 1983, Chaieb 1993), éremologiques (Khatteli 1996, etc...). Ainsi, une importante quantité de publications scientifiques, résultant de ces études est aujourd'hui disponible pour la communauté scientifique. Toutefois, la plupart de ces études sont descriptives et qualitatives. Les études expérimentales aussi difficiles peuvent-elles être, sont généralement rares. Parmi ce genre d'études expérimentales en milieu saharien, on cite le travail de Derbel (2012), ou des essais divers furent réalisées ''*in situ*'', et plus précisément en conditions naturelles sahariennes. En revanche, des aspects relatifs à la valorisation pharmacologique et médicinale de ces espèces sahariennes mériteraient d'être mieux connus, considérant l'intérêt potentiel qu'elles peuvent avoir, si bien entendu l'on tient compte de leur usage traditionnel.

Dans ce contexte, la caractérisation phytochimique et l'étude des activités biologiques des espèces végétales sahariennes constitue aujourd'hui l'un des plus importants défis pour la recherche scientifique au niveau des plantes médicinales.

Toutefois, compte tenu de la forte corrélation qui existe entre les conditions écologiques dans lesquelles les espèces végétales se développent et leurs particularités phytochimiques, notamment leur activité biologique, la caractérisation écologique des sites de collecte des espèces étudiées serait indispensable pour toute interprétation des résultats prévisibles. C'est dans ce contexte que nous fournissons dans la première partie de notre thèse toutes les informations écologiques et géologiques sur les régions sahariennes de Tunisie.

Ainsi, l'objectif de cette étude serait d'identifier l'intérêt biologique, ainsi que les vertus pharmaco-thérapeutiques de certaines espèces végétales sahariennes nord-africaines (Tunisie), en vue d'une meilleure valorisation pharmacologique de ce potentiel biologique. Les expérimentations concerneront ainsi les activités suivantes:

- \* activité antimicrobienne
- \* activité anti-cancéreuse
- \* activité toxique
- \* activité antioxydante

Les résultats prévisibles d'une telle étude, peuvent certainement avoir des retombées non négligeables sur les populations locales sahariennes, et constituer par conséquent des voies à suivre en vue d'une valorisation à plus grande échelle de leurs potentialités médicinales.

Le choix a donc porté sur des taxons exclusivement sahariens, et considérés comme étant les moins connus au niveau de leur activité biologique. Ceci, constitue d'ailleurs le caractère original majeur de ce travail. Il s'agira ainsi de: 1) *Anthyllis henoniana*, 2) *Centropodia forskalii*, 3) *Cornulaca monacantha*, 4) *Ephedra alata-alenda*, 5) *Euphorbia guyoniana*, 6) *Helianthemum confertum*, 7) *Henophyton deserti*, 8) *Motkiopsis ciliata*, et 9) *Spartidium saharae*.

Ainsi, après une introduction générale et les objectifs de l'étude, le mémoire présenté serait de fait structuré en différentes parties et chapitres, à savoir:

- ❖ Partie I, comportant un rappel des caractéristiques de l'environnement saharien et l'intérêt pharmacologique des espèces végétales. Cette partie est à son tour structurée en deux chapitres différents, et relatifs à la végétation et le milieu en zone saharienne, ainsi qu'une revue bibliographique sur les intérêts pharmacologiques et biologiques des espèces végétales.

- ❖ Partie II, relative au matériel végétal étudié et à l'approche méthodologique. Cette partie est structurée en trois chapitres différents, relatifs à : i) la Botanique et l'écologie des espèces étudiées, ii) la phytochimie & l'intérêt biologique de ces espèces, et enfin, iii) la méthodologie et les expérimentations réalisées.
- ❖ Partie III, relatives aux résultats obtenus, aux discussions et perspectives d'avenir. Cette partie est à son tour structurée en quatre chapitres différents, relatifs aux différentes expérimentations réalisées.

**PARTIE I: L'ENVIRONNEMENT SAHARIEN & INTERÊT  
PHARMACOLOGIQUE DES ESPÈCES VÉGÉTALES**

# CHAPITRE I : BREF RAPPEL SUR LA VEGETATION NATURELLE & SON MILIEU EN ZONE SAHARIENNE TUNISIENNE

## 1. Généralités sur la zone saharienne

Selon Ozenda (2004), les régions sahariennes s'étendent depuis le tiers septentrional du continent africain, jusqu'à la mer rouge, soit une superficie totale d'environ  $9 \times 10^6 \text{ Km}^2$ . Les limites du Sahara sont définies à l'ouest par l'océan Atlantique, au nord par les monts de l'Atlas et la Méditerranée, à l'est par la mer rouge et l'Égypte et au sud par le Sahel et la vallée du Niger. Dans ce contexte, il y a lieu de signaler que le Sahara s'étend en grande partie au Maroc, en Algérie, en Tunisie, en Libye, en Égypte, en Mauritanie, au Mali, au Niger, au Tchad et au Soudan. Il s'agit à ce propos de l'exemple le plus caractéristique du désert subtropical, lié à la présence des hautes pressions subtropicales, séparées des basses pressions équatoriales par le front intertropical. Le balancement saisonnier de cette ceinture anticyclonale engendre les divers types de bioclimats rencontrés, et dont le point le plus caractéristique est la longue période de sécheresse dans l'année. Cette sécheresse explique l'indigence des précipitations annuelles. Au niveau géomorphologique, et tenant compte de la répartition des précipitations, il faut rappeler que le Sahara est subdivisé en 3 domaines, à savoir : le Sahara septentrional, central et méridional. Ainsi, le Sahara septentrional, avec environ 1 million de  $\text{km}^2$ , est soumis à une extrême rigueur du climat méditerranéen, où les pluies ont lieu toujours en hiver. La variabilité interannuelle des précipitations, tant dans leur répartition que dans leur intensité, demeure la principale caractéristique bioclimatique de cette région. Au Sahara central, les pluies ont un caractère épisodique, et leur quantité est peu élevée ( $< 25 \text{ mm}$ ). Enfin, le Sahara méridional, est réputé par la pluviosité qui augmente, avec notamment l'occurrence surtout des pluies d'été, résultant globalement un bioclimat plutôt tropical (Ozenda, 2004). Signalons que les caractéristiques du climat saharien résultent essentiellement de la situation en latitude, au niveau du tropique, ce qui entraîne de fortes températures, et au régime des vents qui se traduit par des courants chauds et secs (Ozenda, 2004). Le climat saharien est caractérisé notamment par la faiblesse et l'irrégularité des précipitations, une luminosité intense, une forte évapotranspiration potentielle (ETP) et une forte amplitude thermique. Ces caractéristiques créent des conditions drastiques, difficilement supportables par les êtres vivants de ces écosystèmes, et plus particulièrement la faune et la flore. En zones sahariennes, les précipitations annuelles aussi rares-sont-elles, sont caractérisées par leur faible importance

quantitative et leur caractère torrentiel. Ces précipitations, sont généralement liées aux masses d'air, résultant des perturbations soudano-sahariennes ou sahariennes. Néanmoins, cette insuffisance de pluies sahariennes est accompagnée d'une irrégularité très marquée du régime pluviométrique et d'une variabilité interannuelle considérable, ce qui accentue la sécheresse (Floret & Pontanier 1982). Les isohyètes moyennes annuelles de 100 mm, correspondent d'après Le Houérou (1959) et Ozenda (1983) à la végétation saharienne ou à l'hyperaride. Cette zone s'étend à tout le Sahara septentrional et occidental, puisqu'elle se caractérise par une pluviosité annuelle inférieure à 100 mm, un rapport pluvio-évapotranspiratoire (P/ETP) de 0.04 et un indice d'Aridité (I) ( $P/PET \times 100$ ) est  $3 < I < 6$ , et avec une longueur de la saison sèche d'environ 12 mois : l'indice xérothermique de cette zone est supérieur à 300. Il n'y a pas de saison pluvieuse à proprement parler.

Par ailleurs, considérant le caractère aléatoire des précipitations, les périodes de croissance des végétaux sont drastiques, irrégulières et imprévisibles. Il convient toutefois de noter que les pluies surviennent toujours au cours de l'hiver, contrairement au Sahara central ou méridional (Floret & Pontanier 1982). Le régime thermique du Sahara est plus ou moins unimodal. Les températures moyennes annuelles sont élevées, avec des maxima absolus pouvant atteindre et dépasser 50 °C (le 16 juin 2016, un pic de 57°C fut enregistré à Tataouine), et des minima de janvier variant de 2 à 4 °C (Le Houérou, 1990). La température du sol en surface peut dépasser 70 °C, durant la saison de l'été, et plus précisément sur le sable dunaire.

Malgré les apparences, le Sahara n'est pas une région ventée, mais un paysage où, par suite de sa dénudation, on ressent le plus facilement le vent. Les effets du vent sont partout sensibles et se traduisent par le transport et l'accumulation du sable, le façonnement des dunes, la corrosion et le polissage des roches et surtout l'accentuation de l'évaporation, etc... (Monod, 1992). Au niveau de l'évapotranspiration, d'après Ozenda (2004), l'évaporation se définit par l'épaisseur, exprimée en millimètre, de la couche d'eau évaporée par unité de temps considéré : jours, mois, année. C'est un phénomène physique qui augmente avec la température, la sécheresse et l'agitation de l'air. Le Sahara apparaît comme la région du monde qui possède l'évaporation la plus élevée.

## **2. Le milieu saharien en Tunisie**

La zone saharienne tunisienne peut être définie comme étant la partie du pays recevant une pluviométrie annuelle moyenne inférieure à 100 mm. Du point de vue écologique, Floret & Pontanier (1982) considèrent que cette limite coïncide approximativement avec la limite septentrionale des palmeraies et la limite méridionale de l'Alfa. Cette zone représente environ

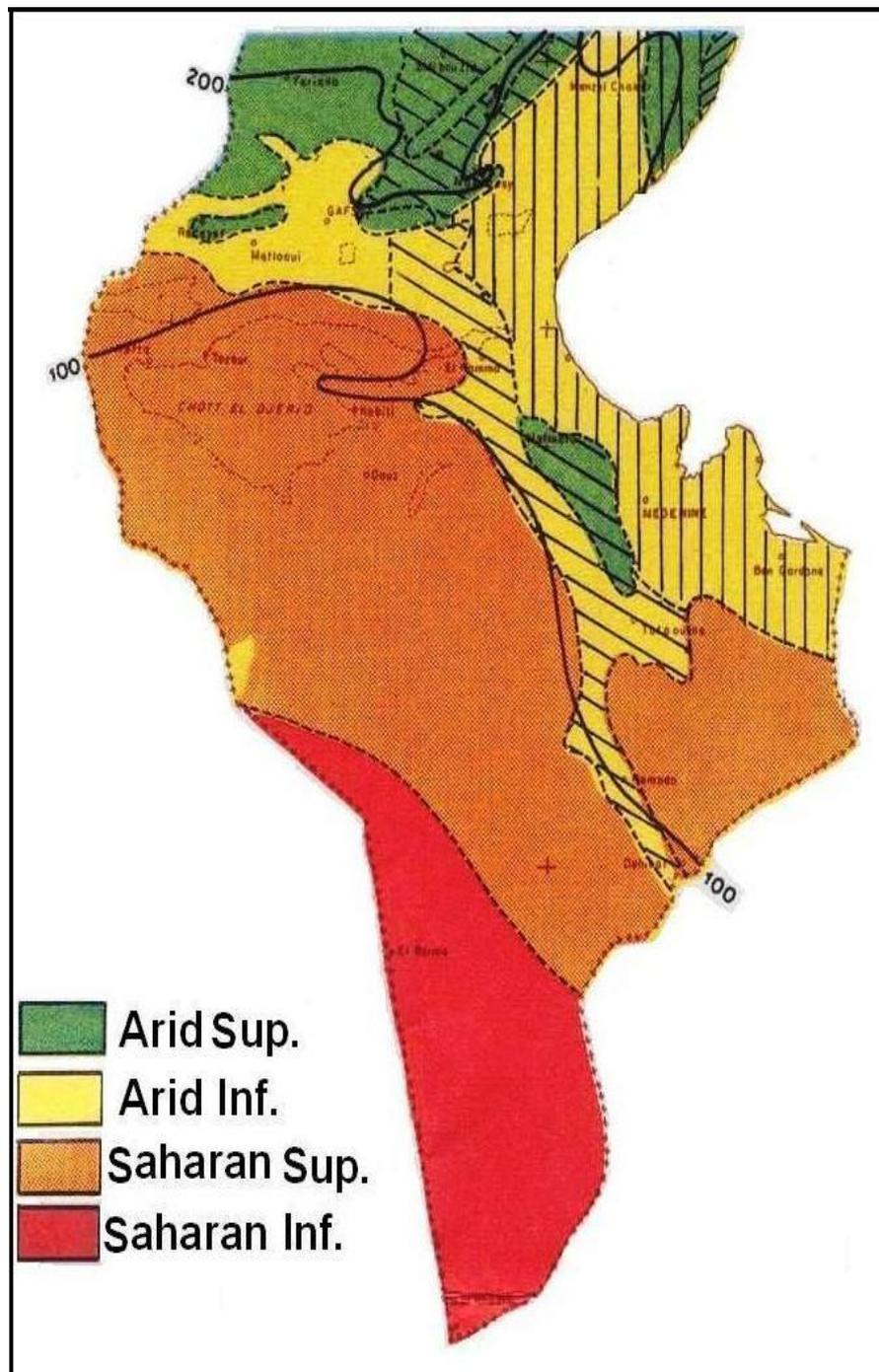
40 % de la surface totale du pays.

## 2.1. Climat

Selon la carte bioclimatique de la Tunisie, le climat désertique est la résultante de l'action opposée de deux autres climats, le premier situé au sud-Ouest, est le climat subtropical saharien sec et chaud, et le second situé dans le golfe de Gabès à l'Est, est le climat méditerranéen relativement humide et tempéré. En effet, selon les mêmes auteurs, ce type de climat est très irrégulier d'une saison à l'autre, voire parfois dans une même saison, à l'exception de l'été qui paraît plus stable et calme. Les principales caractéristiques de ce climat sont les suivantes :

- Précipitations abondantes et orageuses qui sont souvent de très forte intensité avec un régime très variable et irrégulier ; leur répartition est en effet imprévisible. Il n'est pas rare d'observer en 24 heures plus de 50% de la pluviosité de l'année ; le nombre de jours pluvieux se situe généralement entre 15 et 40 seulement en moyenne ;
- Déficit hydrique très important, puisque la demande évaporative de l'atmosphère est de loin supérieure aux apports d'eau par les pluies ;
- Régime thermique très contrasté (fortes amplitudes diurnes, mensuelles et annuelles), caractérisé par des hivers tempérés à doux, et des étés chauds à très chauds, avec un maximum moyen estival (M) > 40°C et un minimum moyen hivernal (m) < 4°C ; la valeur de l'indice Xéothermique qui est d'environ de 320-330 au Nord de la région ; elle atteint 350 à la limite Sud du territoire tunisien ;
- Forte évapotranspiration potentielle (ETP) ;
- Sécheresse quasi-absolue entre mai et septembre ;
- Vents dominants des secteurs Ouest, Nord-Ouest et Sud-Ouest de novembre en avril ; ces vents sont violents, secs et froids ; il s'agit souvent de vents de sable qui endommagent sérieusement les cultures et la pousse des espèces annuelles dans les pâturages ;
- Été caractérisé par des basses pressions thermiques ; avec importante période de sirocco, masse d'air très chaud et sec venant du Sahara, caractérisée par une brusque élévation des températures (10 à 15°C en 1 ou 2 heures) et un abaissement de l'humidité relative de l'air (H < 10%).

La carte qui suit (Figure 1), illustre la répartition des différents étages bioclimatiques, rencontrés en Tunisie méridionale. On y remarque la large dominance des bioclimats aride et saharien, ce qui laisse supposer leur forte influence sur la phytochimie de la végétation saharienne correspondante, et notamment sa teneur qualitative et quantitative en métabolites secondaires.



**Figure 1 :** Carte bioclimatique de la Tunisie saharienne et présaharienne (Gounot & Le Houérou, 1988) ; Echelle 1/10<sup>6</sup>

## 2.2. Couverture Pédologique

Au niveau pédologique, en zone saharienne de Tunisie, on observe des sols le plus souvent bruts. Les processus chimiques d'altération des roches et des minéraux y sont très

peu développés. En revanche, les processus physiques, de désagrégation sont, au contraire dominants d'après Belkhodja et al (1973). Dans ce contexte, cet auteur propose la classification pédologique suivante pour la Tunisie du sud:

### **1.2.1. Les sols bruts d'érosion ou sols squelettiques**

Il s'agit de lithosols dont la roche sous-jacente n'est pas friable et non pénétrable par les racines des végétaux: grès dur granit, et les régosols dont la roche est au contraire, friable : arène granitique, grès friable, etc..

### **1.2.2. Les sols bruts d'apports éoliens**

Le vent y a provoqué l'accumulation des éléments sableux (surtout sables moyens et sable fins) en certains points. D'après l'importance de l'accumulation, on peut distinguer :

- les Nebkas ou micro-dunes, fixées par un arbuste ou une touffe végétale,
- les Barkhanes ou dunes mobiles, en forme de croissant, hautes, en général, de deux ou trois mètres et à convexité au vent,
- les cordons dunaires ou ergs, massifs sableux beaucoup plus importants à la fois par leur hauteur et par leur surface.

### **1.2.3. Les sols d'ablation**

Ils sont caractérisés par leur appauvrissement en éléments fins entraînés par le vent. Ce sont les Regs, recouverts de sables grossiers, cailloux ou pierres, plus ou moins marqués par les processus éoliens.

## **2.3. Paysage Naturel**

En Tunisie saharienne, les facteurs climatiques, géomorphologiques et pédologiques permettent de distinguer un paysage naturel globalement structuré en différentes régions dites naturelles (Le Houérou 1959), présentant chacune une physionomie et une composition caractéristique (Figure 2). D'après Le Houérou (1959) et Floret & Pontanier (1982), les traits essentiels de ces régions sont les suivants:

### **2.3.1. Les Dahars septentrionaux**

La végétation des sols encroûtés est encore relativement dense. Les oueds sont encore fonctionnels dans cette sous-région et les ruissellements s'infiltrant au niveau de contact avec le Grand Erg déterminent un cordon de zone basse d'accumulation, parfois cultivée.

Il s'agit d'une région constituée par le flanc occidental de l'anticlinal de Djeffara. Elle est constituée par des revers de cuestas ; elle s'étend entre le Djebel Tebaga (Kébili) jusqu'à la Hamada El Hamra (Rhadamès). Cette région se subdivise en deux zones très distinctes :

### **2.3.2. Les Dahars méridionaux**

Ce sont des régions plus ou moins sèches. On suppose que les possibilités de culture sont nulles; les écoulements d'oueds sont très rares. Ce sont essentiellement des Regs et des Hamadas ;

### **2.3.3. La Région du Grand Erg oriental**

Elle s'étend sur une superficie d'environ 500 km sur 300 km, dont les deux tiers sont en territoire algérien, et le reste en Tunisie. Cette région constitue une unité géomorphologique originale dont le rôle du vent prédomine. C'est un immense champ de dunes pouvant atteindre 250 m de haut, le plus souvent hérité d'une activité éolienne intense au Quaternaire, aux dépens des alluvions d'oueds entaillant la plateforme saharienne. Cette zone dunaire est délimitée au Nord par la dépression salée du Chott El Djérid, et en Libye, par les Monts Hamadet Nasla. La partie tunisienne de l'Erg Oriental longe la frontière Algéro-Tunisienne sur environ 400 Km, de Hazwa (60 Km de Tozeur) à Bordj El Khadra. Sa largeur, de la frontière à sa limite, dépasse 140 Km. On peut considérer qu'il n'y a aucune région de transition entre l'Erg lui-même et l'arrière-pays nord-oriental (Chott El Djérid) et oriental (Monts de Matmata).

### **2.3.4. Le Nefzaoua**

C'est la petite région d'Oasis localisée au sud du chott El Fedjedj et à l'Est du chott El Djérid à la limite nord du Grand Erg Oriental et une série de reliefs (Djebel Tebaga et Dahars septentrionaux).

### **2.3.5. Le Chott Djérid**

Il s'agit d'une vaste dépression salée, recouverte de sables, totalement défavorable aux implantations humaines. La végétation halophile apparaît sur les bords de la dépression et forme une steppe de densité variable. Le chott s'allonge sur plus de 100 Km vers l'Est et plonge au Nord-Est par le Fedjej jusqu'à 25 Km du littoral. Cette dépression se loge dans une ondulation synclinale qui s'amortit au sud sous le Grand Erg Oriental (Coque 1963). A ce contact avec la plateforme saharienne, cette région constitue une sebkha, ou dépression creusée par l'eau et le vent, et sur-creusée par la déflation éolienne. En fait, les vents turbulents interviennent sur la surface asséchée par l'évaporation et balayent certains éléments, comme les argiles floculées par les sels. Cette érosion a commencé au Quaternaire avec l'aridification du climat. Aujourd'hui, l'altitude de la dépression varie entre 15 et 20 m au-dessus de la mer.

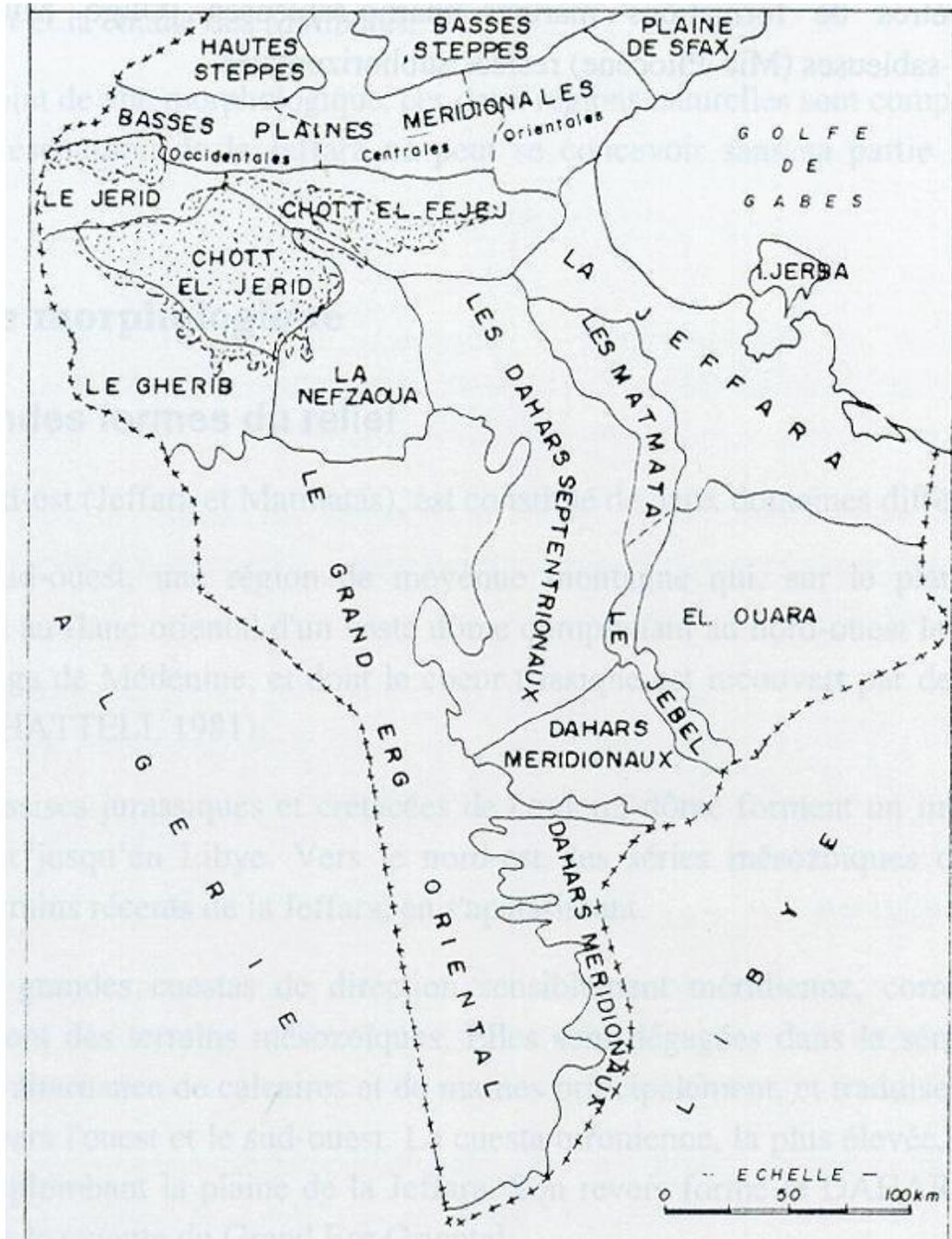


Figure 2. Les régions naturelles du sud de la Tunisie (Le Houérou, 1959)

## **2.4. La couverture géologique**

Comme pour le paysage naturel, la Tunisie méridionale est réputée par la diversité de son substrat géologique (Figure 3). On y rencontre ainsi la dominance du substrat du quaternaire et du miopliocène. Dans les paragraphes qui suivent, nous résumons les traits essentiels de ce substrat géologique, qui lui aussi varie en fonction des régions naturelles.

### **2.4.1. La Jeffara orientale (L'Ouara)**

Il s'agit de la partie orientale de la Jeffara correspond à une surface d'aplanissement qui nivelle imparfaitement les assises résistantes du Trias et du Jurassique, autrefois dressées en cuesta, dont il ne subsiste que des résidus discontinus et de reliefs modestes. La plaine ainsi modelée se prolonge jusqu'à l'escarpement demeuré majeur de la cuesta du crétacé, elle est partout recouverte d'un tapis inégalement épais de sédiments alluviaux quaternaires. Les plus anciens ont un matériel caillouteux consolidé par un encrouement calcaire, ce qui donne un paysage de reg et de hamada. Par endroit, on observe des dépôts limono-sableux du Quaternaire moyen et récent, à teneur variable en gypse, interrompus par des aires d'épandage localisées où s'étalent des argiles salines.

### **2.4.2. Le Dahar**

Au niveau géologique, il s'agit du revers de cuesta crétacé des Matmata qui descend doucement vers la dépression du grand erg oriental. Dans le détail, le modèle du terrain s'accidente d'abord du fait des ondulations affectant les assises calcaires, en second lieu par suite de l'encaissement des oueds qui ont drainé autre fois vers l'Ouest, les eaux de ruissellement suivant la pente structurale. Ces composantes géomorphologiques peuvent donc se résumer à deux familles de milieux. Les croutes caillouteuses portent, sur les parties les plus élevées du Dahar, proches du rebord de la Cuesta, une steppe de *Stipa tenacissima*, qui se dégrade en descendant vers l'Ouest pour donner une végétation très clairsemée, représentée par une association à *Gymnocarpos decander* et *Anthyllis henoniana* (Le Houérou 1969).

### **2.4.3. Le domaine géologique saharien**

S'étalant de la bordure Nord du chott Jerid et du chott Fejej, on peut fixer sa limite vers l'Est au bas du Dahar, dont les épaisses assises calcaires viennent s'enfoncer sous des formations

sédimentaires alluviales au Nord et sous les sables éoliens du Grand Erg, plus au Sud. Il s'agit d'une zone topographiquement basse, par suite d'une subsidence qui s'est accusée depuis au moins le début du Quaternaire. Ainsi, la latitude et la configuration topographique se combinent pour créer les conditions d'un milieu climatique saharien franc.

#### **2.4.4. La dépression des chotts**

Signalons que le chott est bordé par une frange étroite de terrains relativement bien drainés, qui correspondent pour une part à des glacis du Quaternaire ancien et des encroûtements de gypse, et d'autre part à des collines marneuses et sableuses découpées dans l'anticlinal Villafranchien de Tozeur. Sur la bordure méridionale du Jérid (Ghérif et Nefzoua), la topographie beaucoup plus plane est la conséquence d'une évolution sans complications locales dans le Gherib, où n'affleurent que des formations alluviales Quaternaires Villafranchiens qui occupent une large partie du territoire tunisien.

#### **2.4.5. Le Grand Erg Oriental**

Rappelons que pour le Grand Erg oriental, seule une partie restreinte pénètre en territoire tunisien jusqu'aux abords du Dahar. Ainsi, sur la bordure septentrionale, l'Erg se manifeste par des alignements parallèles de dorsales sableuses (Siouf), séparées par des couloirs inégalement spacieux, où affleure le plancher alluvial Quaternaire. L'Erg est du reste précédé en avant de ces reliefs par des «barkhanes» isolées ou groupées. Du côté du Dahar, la bordure de l'Erg se présente soit comme une surface de Reg caillouteux partiellement couvert d'une pellicule de sable, soit comme un Glacis d'épandage alluvial encroûté de Gypse, et par endroits de calcaire. Sur ces deux bordures, les sables actuellement accumulés proviennent pour une part de la déflation exercée sur les surfaces rocheuses ou alluviales voisines, et d'autre part, d'un remaniement du matériel du Grand Erg. A mesure que l'on s'éloigne de la bordure Nord, la complexité de la topographie s'accroît. Les Siouf font place à des accumulations de dunes allongées souvent en Chapelets. Plus au Sud, les cloisons qui obturent les couloirs prennent de l'ampleur et se transforment en imposantes pyramides de sable.

L'importance de cette zone pour notre étude, découle du fait que toutes nos espèces végétales étudiées ici, existent dans cette région. Leur biologie et leur écologie seront de ce fait très marquées par toutes ces caractéristiques édapho-climatiques ci-dessus évoquées.

L'altitude dépasse 200 mètres. Ce matériel sableux est un héritage Quaternaire.

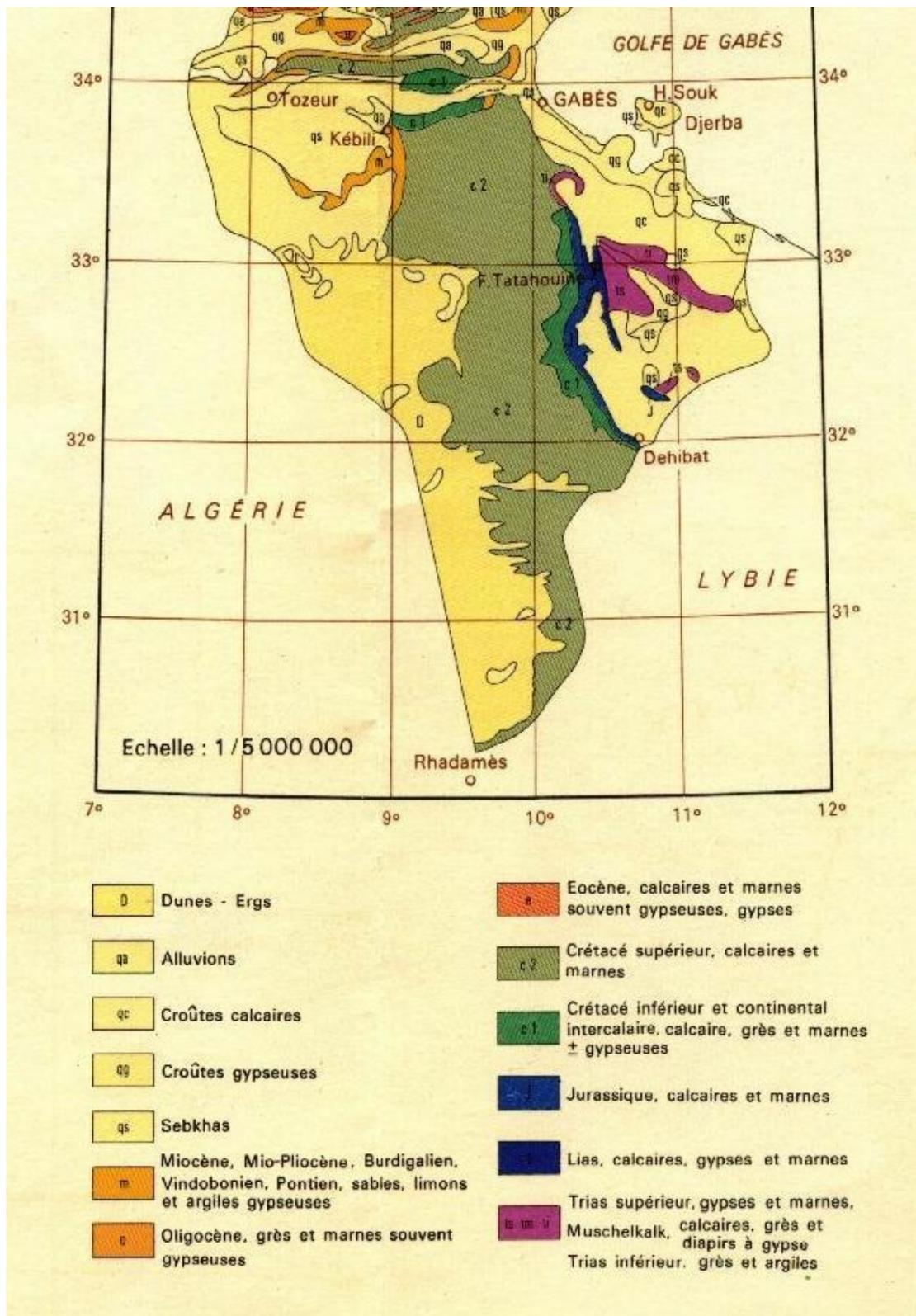


Figure 3 : Carte géologique du Sud Tunisie, (Le Houérou, 1969). Echelle 1/5 10<sup>6</sup>

## **2.5. Conclusion**

L'examen des particularités environnementales du milieu saharien Nord-africain, cas de la Tunisie, révèle des conditions très drastiques qui règnent dans ces régions. Ces conditions marquées notamment par des pluies annuelles très rares et des températures souvent très élevées, engendrent une sécheresse très prolongée dans l'année. Cette sécheresse dépasse selon plusieurs spécialistes de ces régions (Le Houérou 1959 & 1969, Floret & Pontanier 1982 et Chaieb 1993) huit mois dans l'année. Il en résulte une nette influence sur la biologie des êtres vivants, et surtout leur développement d'une physiologie bien adaptée à ces conditions sahariennes. C'est dans ce contexte, que les espèces végétales présentes se caractérisent par leur puissante phytochimie, et notamment leur richesse en substances naturelles ou métabolites secondaires. Ce constat motive à un screening de leur éventuelle activité biologique, et les possibles vertus pharmacologiques qu'elles sont susceptibles d'avoir.

# CHAPITRE II: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES INTERÊTS PHARMACOLOGIQUES & BIOLOGIQUES DES ESPÈCES VÉGÉTALES

## 1. Introduction

Plusieurs centaines de milliers d'espèces différentes composent la flore mondiale. Environ 250 000 d'entre elles ont été décrites et répertoriées. Ces plantes, véritables usines chimiques, synthétisent des molécules appelées métabolites primaires qui leur sont vitales (sucres, acides aminés, protéines, acides nucléiques,...). Elles synthétisent également des molécules qui leur permettent de contrôler leur environnement, de survivre ou encore de se reproduire en éloignant les prédateurs ou en attirant des insectes pollinisateurs (composés phénoliques, terpènes, stéroïdes,...). Ces métabolites secondaires sont extrêmement nombreux. Du fait de leurs structures chimiques très diversifiées et parfois très complexes, certaines de ces molécules naturelles sont efficaces contre les maladies humaines.

L'isolement des principes actifs des plantes commença au début du XIX<sup>ème</sup> siècle. En 1785, une étude fut publiée sur l'utilisation de la digitaline pour son action diurétique et cardiotonique. En 1809, des essais cliniques ont commencé avec des extraits de feuilles. Quelques années plus tard, le principe actif, la digitaline, fut isolé. Les digitales sont aujourd'hui à la base de nombreuses spécialités pharmaceutiques destinées à soigner certaines insuffisances cardiaques. Depuis, plusieurs principes actifs ont été isolés de plantes et leurs dérivés largement utilisés. Ainsi, l'acide salicylique isolé de l'écorce de saule (*Salix alba*), efficace contre la fièvre, les douleurs et les rhumatismes articulaires, a été exploité sous la forme de son dérivé, l'acide acétylsalicylique ou Aspirine® (12 000 tonnes de ventes annuelles mondiales). Et d'autres principes actifs peuvent encore être cités : la morphine de l'opium du pavot (*Papaver somniferum*), la quinine de l'écorce du quinquina (*Chinchona officinalis*), la colchicine du colchique (*Colchicum autumnale*), l'atropine de la belladone (*Atropa belladonna*), la vinblastine et la vincristine de la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*), le taxol de l'if du Pacifique (*Taxus brevifolia*) ou encore la théobromine du cacao (*Theobroma cacao*). Aujourd'hui, près de la moitié des médicaments que nous utilisons ont une composition d'origine végétale, et le quart renferme des extraits de plantes ou des molécules actives provenant directement des plantes. Si l'on s'intéresse aux sources végétales de molécules, il est à noter qu'à peine 2000 à 3000 plantes ont fait l'objet d'études scientifiques, chimiques ou pharmacologiques.

De plus, la plus grande diversité floristique (hot-spots de la biodiversité) se concentre dans les régions tropicales et méditerranéennes représentant plus que 10 % de la surface du globe. De même, les plantes endémiques ou indigènes du Sahara, peuvent représenter de nouvelles sources de métabolites secondaires bioactifs pour répondre aux demandes en matière d'alternatives thérapeutiques, pour diverses maladies et perturbations métaboliques. Dans les paragraphes qui suivent, nous donnons un aperçu, sur les principaux métabolites secondaires des végétaux, ainsi que les principales perturbations de l'organisme, dont l'essentiel est lié aux problèmes de stress.

## **2. Rappel sur les métabolites secondaires des végétaux**

À côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides et lipides), les végétaux accumulent fréquemment des métabolites dits « secondaires » qui représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire (Herbert, 1989). Les métabolites secondaires sont classés en trois grands groupes, parmi lesquels, on cite les composés phénoliques, les terpènes et stéroïdes, et les composés azotés dont les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés, qui possèdent une très large gamme d'activité biologique (Li, 2007). Les métabolites secondaires sont réputés par leurs activités biologiques nombreuses, comme antibactériennes, anticancéreuses, antifongiques, analgésiques, anti-inflammatoires, diurétiques, gastro-intestinales et antioxydantes (Harborne, 1998 ; Bruneton, 2009).

La phytothérapie est souvent présentée comme une médecine naturelle. Toutefois, la phytothérapie n'a pas que des effets bénéfiques. Comme tout produit actif, elle peut avoir des effets indésirables, toxiques et allergiques.

Des molécules très connues (atropine, colchicine, opium, digitaline) sont extraites de plantes et ne sont pas dénuées de toxicité. Des études sur les propriétés phytochimiques ou biologiques de plusieurs produits végétaux ont démontré l'action et le potentiel toxique de ces produits sur les systèmes cellulaires des mammifères (Aline, 2010).

Les remèdes traditionnels utilisés sont, souvent, un mélange de plantes dont la connaissance et les impératifs de préparation, de dosage et de consommation ne sont pas bien maîtrisés. Ainsi, les plantes peuvent contenir des composés chimiques puissants, responsables d'effets indésirables et de toxicité (Khattabi, 2010).

La part des intoxications liées à l'usage des plantes est non négligeable (Benkhiguel, 2011). Très souvent, les plantes sont consommées sans prendre en considération leur toxicité (Veiga Junior et Pinto, 2005). En effet, une toxine est une substance capable de perturber, immédiatement ou à long terme, de façon passagère ou durable, le fonctionnement normal d'un organisme vivant, pouvant aller jusqu'à sa suppression complète et provoquer la mort (Viala et Botta, 2007). Cette toxicité dépend de la nature de la substance, de la dose, de la durée d'exposition et de différents facteurs liés à l'individu (sexe, âge, état nutritionnel et hormonal) (Tron, 2002).

Plusieurs espèces végétales contiennent des familles de métabolites secondaires qui peuvent être toxiques (Nafisi, 2010). Les alcaloïdes forment une grande famille hétérogène de métabolites secondaires, qui présentent un intérêt par leurs propriétés pharmacologiques et leurs applications en médecine. A forte dose, ils sont très toxiques (Bruneton, 1999). Tous les travaux phytochimiques ont mis en évidence au sein des organismes végétaux les biomolécules suivantes :

- ❖ Les flavonoïdes : ils constituent chez les plantes un groupe très diversifié de métabolites secondaires ; ce sont des pigments polyphénoliques possédant de nombreuses vertus thérapeutiques (Macej stobiechi, 2000).
- ❖ Les phénols : ils existent sous une très grande variété, parmi lesquelles on peut citer les acides phénoliques qui sont fortement antioxydants et anti inflammatoires. Ils peuvent avoir des propriétés antivirales (Igor, 2002).
- ❖ Les tanins : toutes les plantes en contiennent à des degrés différents. Ce sont également des composés polyphénoliques. Ces tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation.
- ❖ Les xanthones : sont essentiellement des métabolites secondaires antimicrobiens (Sidibé, 2003).
- ❖ Les coumarines : se trouvent dans de nombreuses espèces végétales, et possèdent des propriétés très diverses. Elles sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires, et de capter les radicaux libres (Igor, 2002). En tant que constituants alimentaires, ces antioxydants naturels semblent contribuer de manière significative dans la prévention des maladies, telles que le cancer ou encore des maladies cardio-

vasculaires (Amadou 2005).

Des travaux antérieurs, ont permis de constater la richesse des espèces sahariennes en ces biomolécules. Ils ont aussi mis en évidence l'intérêt pharmacologique de la flore saharienne, sans oublier les risques de toxicité que cela peut engendrer. A titre d'exemple, on a montré que *Dysphania ambrosioides* L., appartenant à la famille des *Amarantacées*, utilisé comme vermifuge, antispasmodique, carminative, peut présenter une toxicité rénale. Cela constitue une limite à son utilisation malgré ses propriétés thérapeutiques (Kaoubaia, 2011). L'utilisation de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*) entraîne une hypokaliémie, oligurie et les oedèmes, semblables à une néphrite aiguë (Hammouda et al., 2005). *Nigella sativa* L. est une plante indiquée contre les problèmes d'estomac. Elle est utilisée également comme préventive contre l'asthme, le diabète et la diarrhée. Parmi les intoxications dues à l'utilisation de cette plante on peut mentionner une sécheresse de la bouche, une irritation bucco pharyngée, des inflammations de la langue, des amygdales et du rhinopharynx (Anyinam, 1995).

Dans le tableau 1 qui suit, nous synthétisons selon plusieurs auteurs, la relation entre les polyphénols contenus dans des espèces végétales sahariennes nord-africaines et leurs vertus pharmacologiques.

Nous remarquons en outre d'après ce tableau, que d'après nos recherches bibliographiques réalisées, plusieurs espèces de ces régions sahariennes furent étudiées. En revanche, très peu d'aspects ont été étudiés pour les espèces choisies. Ceci constitue déjà une originalité de ce travail, dont l'apport pour la communauté scientifique internationale serait utile.

**Tableau 1 :** Relation entre la nature des biomolécules chez certaines espèces végétales sahariennes nord-africaines et leurs activités biologiques.

<b>Polyphénols</b>	<b>Activités biologiques testées</b>	<b>Exemple d'espèces nord-africaines</b>
Acides phénols (cinnamiques & benzoïques)	Antibactériennes	<i>Paronychia argentea</i> (Bouanani & al., 2010).
	Antifongiques	<i>Daphne gnidium</i> (Cottiglia & al., 2008).
	Antioxydantes	<i>Tamarix pauciovulata</i> (Younos & al. 2005).
Coumarines	Protectrices vasculaires et antioedémateuses	<i>Calendula officinalis</i> (Kabera & al. 2000).
Flavonoïdes	Antitumorales Antiinflammatoires	<i>Haloxylon scoparium</i> (El Shazli & al. 2005).
	Hypotenseurs et diurétiques	<i>Malva parviflora</i> (Boual & al. 2013).
	Antioxydantes	<i>Thymaelaea hirsuta</i> (Dohou & al. 2003).
Anthocyanes	Protectrices capillaro-veineux	<i>Inula crithmoides</i> (Belloum & al. 2013).
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur le collagène	<i>Artemisia campestris</i> (Akrouit & al. 2011).
	Antioxydantes	<i>Calotropis procera</i> (Jain & al. 1996).
	Anti-tumorales et Antifongiques	<i>Arthrophytum schmittianum</i> (Mohammedi 2013).
	Anti-inflammatoires	<i>Pistacia lentiscus</i> (Baratto & al. 2003).
Tanins galliques et catéchiques	Anti-oxydantes	<i>Paronychia chlorothyrsa</i> (Chaudhri et al. 1988)
		<i>Capparis spinosa</i> (Maddour & al. (2013).

### 3. Rappel sur les perturbations métaboliques liées au stress

#### 3.1. Stress oxydatif :

Le stress oxydatif fut défini par Favier (2003), comme étant le résultat d'un déséquilibre entre la production des radicaux libres et leur destruction par les systèmes de défense antioxydants. Des facteurs exogènes comme, les polluants environnementaux, les radiations, les solvants organiques, le tabac ainsi que les agents pathogènes, sont incriminés dans la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Ansari 1997 ; Chu *et. al.* 2010).

##### 3.1.1. Cibles du stress oxydatif

Les phénomènes radicalaires de base sont utiles au bon fonctionnement de l'organisme. L'altération des composants cellulaires et des structures tissulaires intervient lorsque l'intensité de ces radicaux augmente, et dépasse la quantité des antioxydants disponibles. Tous les tissus et tous leurs composants comme les lipides, protéines, glucides et ADN (Aurasseau 2002 ; Valko *et. al.* 2006) peuvent être altérés. Ces altérations accentuent le risque d'occurrence de plus de 30 processus de différentes maladies (Aruoma 1998). Parmi ces maladies, on peut à juste titre citer : l'Alzheimer (Smith *et al.*, 1996 ; Smith *et al.*, 2004), la maladie de Parkinson (Bolton *et al.*, 2000), la maladie de Creutzfeldt Jacob et de méningo-céphalites (Ali *et al.*, 2008), les maladies cardiovasculaires et déficience cardiaque (Jha *et al.*, 1995), les œdèmes et vieillissement prématuré de la peau (Georgetti *et al.*, 2003) et le cancer (Ali *et al.*, 2008). Sur la figure 4 ci-dessous, on illustre les différentes cibles du stress oxydatif.

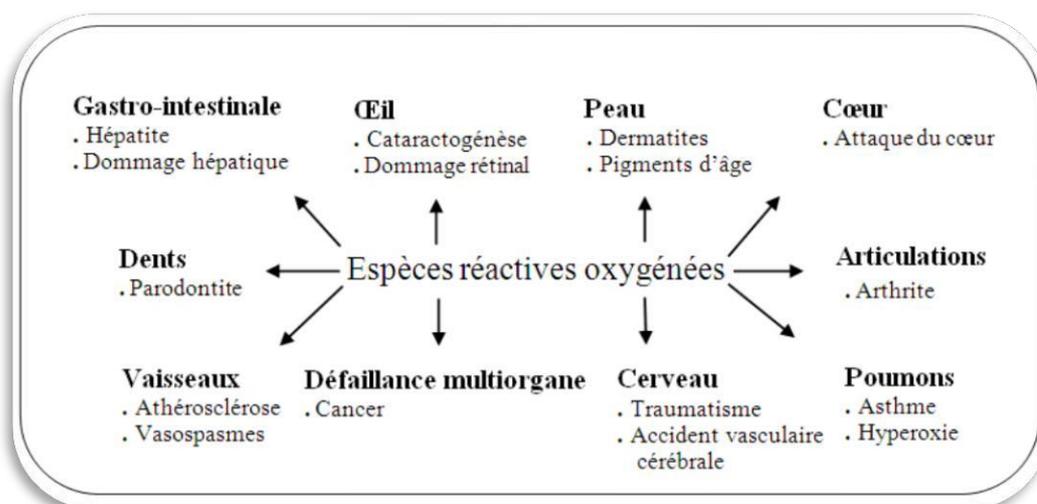


Figure 4: Les différents organes cibles du stress oxydatif (Ali & al, 2008).

Pour contourner les dommages causés par les ERO, la cellule fait appel à des systèmes de défense, communément appelés antioxydants. En effet, un antioxydant est défini comme toute substance ayant la capacité de retarder, prévenir ou réparer un dommage oxydatif d'une molécule cible (Halliwell & Gutteridge 2007). Ainsi, les antioxydants servent à contrôler le niveau des espèces réactives pour minimiser le dommage oxydatif (Tang & Halliwell 2010).

### **3.1. 2. Origines et le rôle de certains antioxydants**

En plus des substances propres à l'organisme, les médicaments, l'alimentation et les espèces végétales peuvent être également des sources d'antioxydants. Dans ce contexte, nous détaillons dans le paragraphe qui suit, le principe d'action de chacun de ces éléments.

a. Les médicaments : le probucol par exemple est un médicament qui, en plus de ses effets reconnus dans la baisse de cholestérol, prévient l'athérogenèse en agissant comme antioxydant.

b. Les sources alimentaires : ce sont principalement : les vitamines C et E, le sélénium et le  $\beta$ -carotène. La vitamine C ou acide ascorbique est un puissant réducteur. Il est présent dans les légumes, les choux, le poivron, les agrumes (Colette 2003).

c. Les antioxydants naturels: Ce sont des biomolécules secrétés essentiellement par les plantes. Parmi ces plantes, nous pouvons citer l'ail (*Allium sativum*) et le Ginkgo (*Ginkgo biloba*) qui sont très riches en antioxydants. Ces espèces sont souvent utilisées dans le traitement des maladies cardio-vasculaires et circulatoires, dues au vieillissement (Igor Passi 2002).

### **3.2. Infections bactériennes et antibiothérapie**

Les infections bactériennes sont causées par différents micro-organismes de Gram + et Gram-, et sont la cause des maladies les plus fatales et des épidémies les plus répandues. La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. Cependant, la prescription à grande échelle de ces agents est parfois inappropriée outre leur utilisation abusive sont à l'origine de l'apparition de la multi résistance bactérienne. D'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies, qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes (Billing et Sherman 1998). L'usage des plantes, dites médicinales, constitue aujourd'hui une excellente alternative, de remplacement de l'antibiothérapie. C'est dans ce contexte, que nous envisageons de réaliser des essais antibactériens avec les extraits des espèces végétales sahariennes. Les résultats prévisibles permettront de valoriser ces espèces en vue d'une utilisation à une échelle plus

industrielle.

### **3.3. Rappel des principes de la toxicologie**

#### **3.3.1. Notion de toxicologie**

La toxicologie est l'étude des substances toxiques et, plus précisément, l'identification et l'évaluation quantitative des conséquences néfastes liées à l'exposition à des agents physiques, chimiques ou de toute autre nature (Silbergeld, 2000). La toxicologie fait appel, tant pour ses connaissances que pour sa démarche de recherche ou ses méthodes, à la plupart des sciences biologiques fondamentales, aux disciplines médicales, à l'épidémiologie et à divers domaines de la chimie et de la physique. Elle s'étend de la recherche fondamentale sur le mécanisme d'action des agents toxiques à la mise au point et à l'interprétation de tests normalisés permettant de caractériser les propriétés toxiques de ces agents. Elle fournit à la médecine et à l'épidémiologie des informations indispensables pour comprendre l'étiologie et établir le lien entre les expositions, y compris professionnelles, et les pathologies observées.

#### **3.3.2. Cheminement d'un Agent toxique dans l'organisme**

Un produit qui pénètre dans l'organisme peut avoir des effets bénéfiques ou néfastes. Inversement, l'organisme peut agir sur ce produit par métabolisme. Plusieurs facteurs interviennent dans les processus d'action toxique, notamment les phases toxicodynamiques et toxicocinétiques (Lapointe, 2004) :

- La toxicodynamie s'intéresse à l'influence qu'exerce un toxique sur l'organisme, et aux facteurs qui interviennent dans la réponse toxique.
- La toxicocinétique s'intéresse à l'influence qu'exerce l'organisme sur un toxique. Cette influence découle des processus (l'absorption, la distribution, le métabolisme, l'élimination) qui gouvernent le cheminement du toxique dans l'organisme.

##### **3.3.2.1. L'absorption**

On appelle absorption le processus de pénétration d'un produit dans l'organisme. Il s'agit d'une étape importante, car, tant qu'il n'a pas pénétré dans la circulation sanguine, un produit ne peut causer d'action toxique systémique. L'absorption peut se dérouler sur 3 sites principaux : le tube digestif, essentiellement au niveau de l'estomac et de l'intestin ; les poumons au niveau des alvéoles pulmonaires ; et la peau au niveau de l'épiderme et du derme (Tron et al., 2002).

### **3.3.2.2. La distribution**

Après avoir atteint la circulation sanguine, le produit peut être transporté dans tout l'organisme. C'est ce qu'on appelle la distribution. En plus de l'oxygène, de divers éléments nutritifs essentiels au fonctionnement de l'organisme et des déchets, le sang transporte aussi des toxiques. Ceux-ci peuvent alors entrer en contact avec des cellules et se fixer dans certains tissus ou organes. A titre d'exemple, les pesticides organochlorés comme le DDT se concentrent dans les tissus adipeux. Ils peuvent y rester emmagasinés sans causer d'effets toxiques pendant une période plus ou moins longue. En revanche, ils peuvent causer des effets toxiques dans d'autres tissus ou organes où ils sont présents en quantités moindres. La nature, l'intensité et la localisation de ces perturbations dans l'organisme diffèrent d'un produit à l'autre et dépendent souvent de la dose. Lors de leur transport sanguin, les toxiques peuvent être liées aux hématies, aux composants plasmatiques, ou se trouver à l'état libre non liées dans le sang. Le monoxyde de carbone, l'arsenic, le mercure organique et le chrome hexavalent ont une forte affinité pour les hématies, alors que le mercure inorganique et le chrome trivalent montrent une prédilection pour les protéines plasmatiques. De nombreuses autres substances sont également liées aux protéines plasmatiques. Seule la fraction libre est disponible pour la filtration et la diffusion vers les organes d'élimination. Ainsi, la liaison sanguine peut faire augmenter la durée du séjour dans l'organisme et diminuer la captation tissulaire au niveau des organes cibles (Lapointe, 2004 ; Holmberg et *al.*, 2000).

### **3.3.2.3. La biotransformation (métabolisme)**

Pendant ou après son transport dans le sang, le toxique peut entrer en contact avec différentes cellules de l'organisme qui ont la capacité de le transformer. L'ensemble des réactions de la transformation métabolique est appelé biotransformation, tandis que les produits de la biotransformation sont appelés métabolites. Deux types de réactions sont observés :

- Réactions de phase 1 : oxydation, réduction et hydrolyse
- Réactions de phase 2 : production d'un conjugué ou d'un métabolite à partir du toxique d'origine.

Il peut en résulter un produit moins toxique (détoxification) ou plus toxique (activation), l'accumulation ou l'élimination du produit et de ses métabolites. La transformation des toxiques est surtout effectuée par le foie, véritable laboratoire chimique de l'organisme, qui contient une

multitude d'enzymes. Il enrichit le sang d'éléments nutritifs et le purifie en concentrant et en éliminant beaucoup de substances. D'autres organes tels que les poumons et les reins peuvent aussi transformer des toxiques grâce aux enzymes métabolisant les toxiques (Lapointe, 2004 ; Tron et al., 2002).

### **3.3.2.4. L'excrétion**

Ce processus consiste à rejeter le produit inchangé ou ses métabolites à l'extérieur de l'organisme. L'excrétion peut se faire par voie rénale (l'urine), gastro-intestinale (les selles), pulmonaire (l'air expiré), cutanée (la sueur) ou lactée (le lait) (Lapointe, 2004).

### **3.3.3. L'effet toxique**

#### **3.3.3.1. Définition**

Lorsqu'un individu absorbe des produits chimiques, divers effets biologiques peuvent se produire et se révéler bénéfiques ou néfastes. La notion d'effet toxique suppose des conséquences nocives pour l'organisme. L'absorption d'une substance en faible quantité peut s'avérer très toxique et provoquer des lésions graves, tandis que l'absorption en grande quantité d'une autre substance peu toxique peut produire un effet bénin. L'effet toxique est ainsi lié à la notion de toxicité. Il s'agit de la capacité inhérente à une substance chimique de produire des effets nocifs chez un organisme vivant et qui en font une substance dangereuse.

L'effet néfaste est lié à la dose, à la voie d'absorption, au type et à la gravité des lésions ainsi qu'au temps nécessaire à l'apparition d'une lésion. Un effet aigu se fait sentir dans un temps relativement court, tandis qu'un effet chronique ne se manifeste qu'après un temps d'exposition relativement long et de façon permanente (Lapointe, 2004).

#### **3.3.3.2. Evaluation des effets toxiques**

L'évaluation de la toxicité s'appuie sur des études qualitatives ou quantitatives adéquates. Il existe plusieurs types d'études qui permettent d'évaluer les effets d'un toxique. On peut les classer dans quatre catégories (Lapointe, 2004) :

- Les études épidémiologiques, qui comparent plusieurs groupes d'individus ou les études de cas;
- les études expérimentales *in vivo*, qui utilisent des animaux ;

- les études *in vitro*, effectuées sur des cultures de tissus ou des cellules et ;
- les études théoriques par modélisation.

Aussi, dans un objectif d'évaluer la toxicité des extraits des espèces retenues dans cette étude, nous avons effectués des expérimentations *in vivo* sur des larves de L'Artémie (*Artemia nauplii*), espèce de crustacé vivant dans les [lacs salés](#), les [lagunes](#) et les [marais salants](#).

### **3.4. Activité anticancéreuse des substances naturelles**

Rappelons que le cancer est une cause majeure de décès dans le monde. En effet, sur le total de décès enregistrés au niveau mondial, 15 % de ces décès étaient imputables au cancer, soit plus que la proportion de décès causés par le VIH/SIDA, la tuberculose et le paludisme réunis (OMS, 2006). Dans les pays industrialisés, il constitue la deuxième cause de mortalité après les maladies cardiovasculaires (OMS, 2006). Selon des projections de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), d'ici à 2020 le nombre de décès dû au cancer va connaître une augmentation considérable dans les pays en développement, aussi bien en Asie, en Afrique qu'en Amérique Latine et ce, principalement en raison du vieillissement constant de la population humaine et de l'augmentation de la pollution (Rastogi *et al.*, 2004). Dans les pays en voie de développement, la médecine traditionnelle est parfois la seule source de soins abordable et accessible, surtout pour les patients les plus pauvres. Cette médecine traditionnelle utilise pour l'essentiel des thérapies à base de plantes. Or, plusieurs molécules anticancéreuses proviennent de plantes médicinales. Le taxol est une célèbre molécule anticancéreuse qui a été isolée pour la première fois à partir de l'if du Pacifique *Taxus brevifolia*. dans les années 1960, et provient d'un criblage (test de nombreuses molécules) au National Cancer Institute, qui avait mis en place un important programme pour rechercher des molécules anticancéreuses, à partir des espèces végétales. C'est ainsi que 108 000 extraits avaient été préparés à partir de 35000 espèces végétales, puis évalués pour leur cytotoxicité sur des cellules cancéreuses. Parmi les extraits actifs se trouvait un extrait des écorces d'if du Pacifique. Après purification de cet extrait, on a trouvé le taxol cytotoxique et également actif *in vivo*, pour le traitement de certaines maladies comme le cancer. Aussi dans un objectif de tester l'effet anticancéreux des espèces sahariennes, nous avons effectué des essais anti-tumoraux par les extraits de ces espèces. Les résultats de ces essais seront exposés dans les chapitres qui suivent.

**PARTIE II : MATÉRIEL VÉGÉTAL ÉTUDIÉ & APPROCHE  
METHODOLOGIQUE ADOPTEE**

# CHAPITRE I : BOTANIQUE & ECOLOGIE DES ESPÈCES RETENUES

## 1. Introduction

Rappelons que notre travail concerne un total de neuf espèces végétales strictement sahariennes, et appartenant à huit familles botaniques. Ces espèces se développent toutes en Tunisie méridionale, et précisément au niveau du Grand Erg oriental. Il s'agit de:

- Ephedra alata-alenda*, (Stapf) Trab. (Ephedraceae)
- Anthyllis henoniana*, Coss. (Fabaceae)
- Centropodia forskalii*, (vahl) Cope. (Poaceae)
- Cornulaca monacantha*, Delile. (Amaranthaceae)
- Euphorbia guyoniana*, Boiss. & Reut. (Euphorbiaceae)
- Helianthemum confertum*, Dunal. (Cistaceae)
- Henophyton deserti*, (Coss. & Durieu). (Brassicaceae)
- Moltkiopsis ciliata*, (Forssk.) I.M.Johnst. (Boraginaceae)
- Spartidium saharae*. (Coss. & Durieu) Pomel. (Fabaceae)

Notre choix a exclusivement porté sur des taxons pérennes, en raison de leur probable importante teneur en métabolites secondaires, et donc de leur probable activité pharmacologique. En outre, hormis *Centropodia forskalii*, qui est une *Poaceae* pérenne, et unique espèce herbacée, les autres espèces sont toutes des ligneuses. Il s'agit en outre de taxons capables de tirer le meilleur profit des faibles précipitations, rares et mal réparties dans le temps sous bioclimat saharien.

Sur un plan écologique, ces taxons constituent des piliers au sein des communautés végétales sahariennes. Leur développement dans les champs de dunes parfois très hautes, atteste de leur forte adaptation écophysio-logique à cet environnement saharien (Chaieb & al 1991). En outre, leurs exigences écophysio-logiques germinatives (Derbel & al 2010), leur permettent de coloniser facilement ce milieu dunaire, très mobile sous l'action éolienne. Enfin au niveau ethnobotanique, la majorité de ces espèces font l'objet d'un usage pharmacologique traditionnel, notamment par les populations des régions sahariennes (Le Floch 1983).

Sur cette base, nous rapportons dans ce qui suit, l'index synonymique, les principales caractéristiques botaniques, ainsi que la classification systématique de chacune d'entre-elles.

## 2. Index synonymique des espèces étudiées

Les travaux relatifs à la biodiversité et surtout à la biodiversité végétale sont devenus une source de connaissances concernant la richesse biologique au niveau des territoires (écosystèmes, paysages, biomes, régions, pays, continents). En effet, les études vieillissent, le recours à de nouveaux moyens d'investigation, les nouvelles prospections menées, rendent en partie obsolètes des travaux anciens. Les points de vue des taxonomistes et des nomenclaturistes évoluent. Des mises à jour périodiques sont alors réalisées, pour continuer à satisfaire aux critères de qualité scientifique. Il reste évident qu'avec l'arrivée des moyens modernes de classification phylogénétique et évolutive (marqueurs moléculaires), la nomenclature de plusieurs espèces végétales, ou bien des familles entières ont été aujourd'hui modifiées. A ce propos, on peut citer à juste titre, l'ancienne famille des *Liliaceae* qui avec les nouvelles approches de classification a éclaté en différentes familles. Dans ce contexte, la flore d'Afrique du Nord de Maire, ainsi que les Flores locales de Tunisie (Cuénod, 1954 ; Pottier-Alapetite, 1979 & 1981), d'Algérie (Quézel & Santa, 1963) et du Maroc (Nègre 1961), ont connu de profondes modifications taxinomiques, notamment suite aux travaux Le Floch & Boulos (2008) et de Dobignard & Chatelain (2010). Ces auteurs ont produit le premier volume d'une œuvre intitulée *Index synonymique de la Flore d'Afrique du Nord*. Il s'agit là d'un travail essentiel, une étape majeure vers la constitution d'une base de données nomenclaturale, apte à être valorisée par les chercheurs actuels. Cependant, en dépit de cet effort et cette évolution taxinomique de la flore d'Afrique du Nord, plusieurs publications scientifiques, parfois même dans des revues de rang A, continuent à utiliser des désignations obsolètes. Parallèlement, de nombreux taxons (espèces, sous-espèces et variétés) jusqu'alors ignorés sont aujourd'hui considérés comme appartenant à la flore de Tunisie.

Ainsi, dans un objectif de collecte du maximum d'informations sur les espèces retenues, notamment celles qui sont relatives à leurs caractéristiques botaniques, écologiques et phytochimiques, nous avons fait une recherche bibliographique exhaustive sur les éventuels synonymes de ces espèces. Les résultats de cette recherche permettent de cibler l'information scientifique disponible sur ces espèces. Ainsi, dans le tableau 2 qui suit, nous donnons la nomenclature en vigueur ainsi que l'index synonymique des espèces étudiées.

**Tableau 2:** Nomenclature en vigueur et synonymes des espèces étudiées

N°	Espèce	Synonymes
1	<i>Anthyllis henoniana</i> Coss.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Anthyllis sericea</i> subsp. <i>henonia</i> (Batt.) Maire</li> <li>• <i>Anthyllis sericea</i> subsp. <i>henoniana</i> (Coss.)Maire</li> <li>• <i>Anthyllis subsimplex</i> Pomel</li> </ul>
2	<i>Centropodia forskalii</i> (Vahl) Cope.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Avena forskalii</i> Vahl, <i>Danthonia forskalii</i> (Vahl) R. Br.</li> <li>• <i>Asthenatherum forskalii</i> (Vahl) Nevski</li> </ul>
3	<i>Cornulaca monacantha</i> Delile	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sans Synonyme</li> </ul>
4	<i>Ephedra alata</i> Decne. subsp. <i>alenda</i> (Stapf)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Ephedra alata</i> var. <i>alenda</i> (Stapf.) Trabut</li> </ul>
5	<i>Euphorbia guyoniana</i> Boiss. & Reut.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sans Synonyme</li> </ul>
6	<i>Henophyton deserti</i> Coss. & Dur.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Oudneya deserti</i> (Coss. &amp; Dur.) Bullock</li> <li>• <i>Oudneya africana</i>, sensu auct. subsp. <i>deserti</i></li> <li>• <i>Oudneya africana</i> subsp. <i>africana</i> Le Houér.</li> </ul>
7	<i>Helianthemum confertum</i> Dunal	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Helianthemum brachypodum</i> (Maire) Greuter &amp; Burdet</li> <li>• <i>Helianthemum confertum</i> var. <i>brachypodum</i> Maire</li> </ul>
8	<i>Moltkiopsis ciliata</i> (Forssk.) I.M.Johnst.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Lithospermum ciliatum</i> Forssk.</li> <li>• <i>Lithospermum angustifolium</i> Forssk.</li> <li>• <i>Lithospermum callosum</i> Vahl</li> <li>• <i>Moltkia ciliata</i> (Forssk.) Maire</li> </ul>
9	<i>Spartidium saharae</i> (Coss. & Durieu) Pomel	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Spartium sericeum</i> Ait.</li> <li>• <i>Genista saharae</i> Coss. &amp; Durieu</li> <li>• <i>Calobrota saharae</i> (Coss. &amp; Dur.) Boatwr. &amp; B.E. Van Wyk</li> </ul>

### 3. Caractéristiques botaniques et classification systématique des espèces étudiées

Signalons que pour la classification systématique des espèces étudiées, nous tenterons de fournir des informations relatives à la classification botanique traditionnelle et la classification moderne ou phylogénétique. Pour récolter ces informations, nous nous sommes basés sur plusieurs références, notamment la Flore Med-Checklist (Greuter & al 1981-1989) et le catalogue de Dobignard et Chatelain (2010). Cependant, compte tenu des disparités des données systématiques, disponibles dans la littérature, le lecteur remarquera certaines différences.

#### 3.1. *Anthyllis henoniana* Coss.

##### 3.1.1. Description botanique & écologie

Il s'agit d'un chaméphyte (Raunkiaer, 1934), dont les tiges sont ligneuses et rameuses (Planche 1). Selon Pottier-Alapetite (1981), les feuilles de cette espèce sont argentées et composées de 3 à 5 folioles. Les fleurs sont en capitules de 3 à 10 fleurs de couleur blanc rosé pale. Il s'agit d'une espèce caractéristique des steppes subdésertiques et désertiques de la Tunisie. Sur le plan écologique, ce taxon est généralement inféodé aux sols squelettiques et marginaux, et plus précisément au niveau des régions naturelles des Dahars (septentrionaux et méridionaux). Elle forme des steppes de haute valeur pastorale des régions sahariennes. Par sa teneur élevée en matières azotées digestibles, elle contribue au maintien de la fertilité chimique du sol, et surtout facilite l'installation d'autres espèces végétales, notamment les *Poaceae*.

##### 3.1.2. Classification

Selon la Flore Medcheklist (Greuter & al 1981-1989) et selon le catalogue de Dobignard et Chatelain (2010), la position systématique d'*Anthyllis henoniana* est la suivante :

Classification phylogénétique	
Sous classe	<i>Rosidae</i>
Ordre	<i>Fabales</i>
Famille	<i>Fabaceae</i>
Sous famille	<i>Faboideae</i>
Genre	<i>Anthyllis</i>
Espèce	<i>henoniana</i>



**Planche 1** : Détail d'un individu d'*Anthyllis henoniana* en fleurs (A), rameau fleuri (B) et détail de la fleur (C).

## 3.2. *Centropodia forsskaolii*

### 3.2.1. Description botanique & écologie

Il s'agit d'un hémicryptophyte (Raunkiaer 1934), à tige cespiteuse avec des chaumes le plus souvent traçants et décombantes, des nœuds solides, distaux et pubescents. Le limbe est caduc, plat et bien développé. Les feuilles sont raides et glauques. La surface du limbe est nervurée et pubère; le sommet du limbe est piquant. L'inflorescence est une panicule, de petite taille, embrassé à la base par une feuille réduite, et les épillets sont solitaires. Les fleurs sont cunéiformes et charnues. A maturité, on assiste à la production d'un caryopse avec péricarpe adhérent.

Selon la flore de Tunisie (Cuénod et al 1954), cette espèce colonise les sables profonds des régions sahariennes de Tunisie.

Au niveau écologique, *C. forsskaolii*, est réputée par sa présence sur les steppes du Grand Erg oriental. Par son système racinaire superficielle, elle valorise les faibles précipitations qui ont lieu dans les régions sahariennes. L'apparition de l'espèce se fait notamment en année à pluviosité moyenne, autrement, elle demeure à l'état de bourgeons dans le sol.

### 3.2.2. Classification systématique

Selon la catalogue de Dobignard et Chatelain (2010), la position systématique de *Centropodia forsskaolii* est la suivante:

#### Classification traditionnelle

Classification phylogénétique	
Ordre	<i>Poales</i>
Famille	<i>Poaceae</i>
Sous-famille	<i>Danthonioideae</i>
Genre	<i>Centropodia</i>
Espèce	<i>forsskaolii</i>



**Planche 2:** Individu de *Centropodia forsskaoli* (A), avec tiges décombantes, epis formée (B)

### **3.3. *Cornulaca monacantha***

#### **3.3.1. Description botanique**

C'est un sous-arbrisseau très rameux dès sa base. Les rameaux ne sont pas articulés. On y observe beaucoup de feuilles réduites et à extrémités très épineuses (Planche 3). Ces feuilles sont alternes, épaisses et terminées en longue pointe épineuse. La fleur est composée de 5 étamines alternant avec 5 staminodes très courts, soudés ensemble en cupule enveloppant l'ovaire. Le péricône fructifère induré, non ailé, dont une des pièces se termine en soie. Le fruit est ovoïde et la graine a une position verticale au sein du fruit.

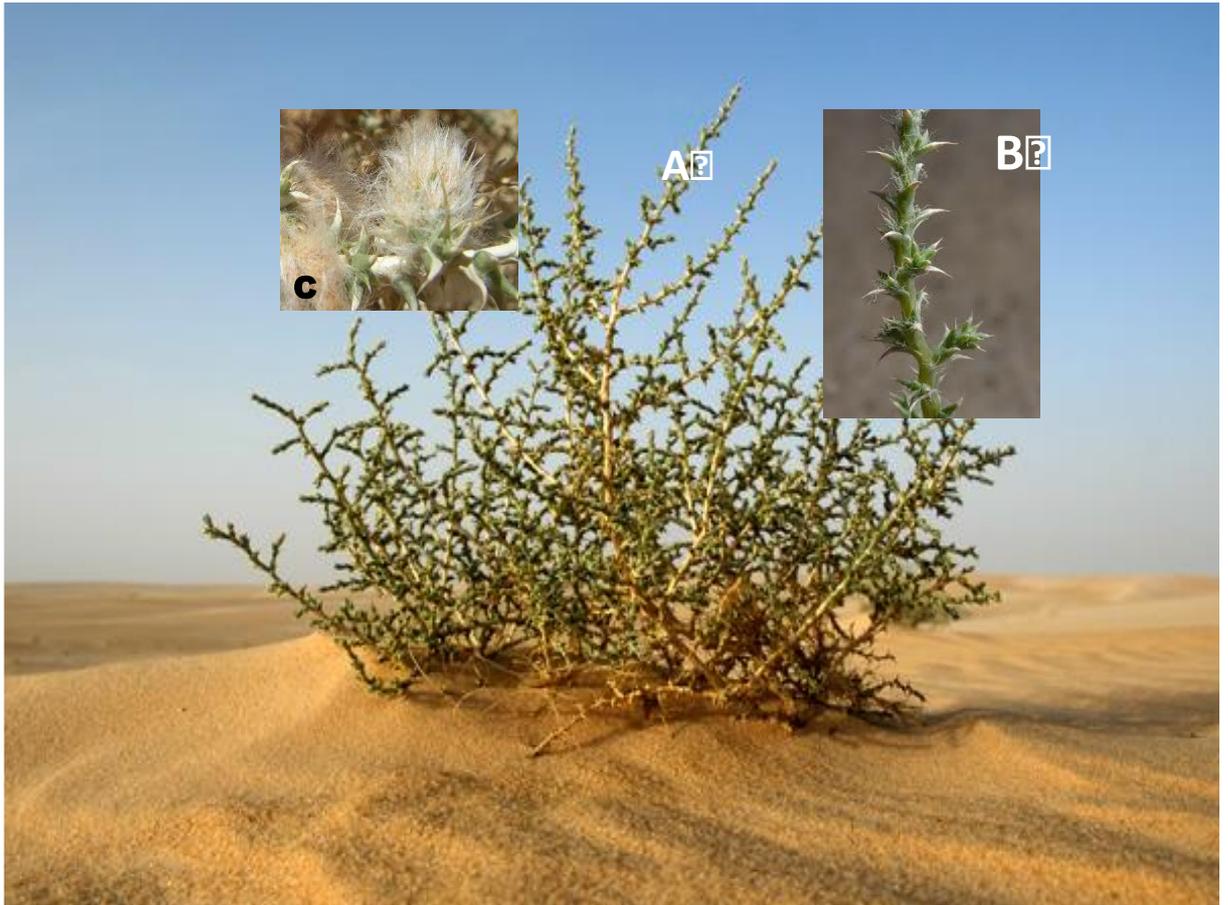
Au niveau écologique, cette espèce est surtout présente dans les zones sahariennes d'Afrique du Nord. Elle colonise surtout les sols sableux plus ou moins fixés et profonds. Cette espèce n'est pas appétente pour les animaux domestiques et sauvages, en raison de son port épineux et en coussinet.

#### **3.3.2. Classification systématique**

Selon la littérature, la classification botanique de *Cornulaca monacantha* est la suivante :

##### **Classification phylogénétique**

Ordre : Caryophyllales  
Famille : Amaranthaceae  
Sous famille: Salsoloideae  
Genre: *Cornulaca*  
Espèce : *monacantha*



**Planche 3** : Port de *Cornulaca monacantha* (A), rameau feuillé (B) et fleur (C).

### 3.4. *Ephedra alata* subsp. *alenda* (Stapf) Batt. & Trab.

#### 3.4.1. Description botanique

Il s'agit de l'un des rares arbustes des zones sahariennes (planche 4), également considéré comme nanophanérophyte au sens de Raunkiaer (1934). Les rameaux sont articulés et portent au niveau des nœuds des feuilles réduites en écailles et opposées, alternes. Les fleurs unisexuées sont groupées en petits cônes. Les fleurs mâles et femelles sont généralement sur des pieds différents. Toutefois, on peut dans certains cas observer des individus portant les deux types de fleurs. Les cônes femelles à bractées s'accroissent pendant la maturation.

Au niveau écologique, *E. alata-alenda* est une excellente espèce fixatrice de sable éolien. Toutefois, la qualité de son charbon de bois, apprécié par les populations sahariennes, l'expose au phénomène du déboisement. C'est ainsi, qu'elle a tendance à devenir rare en régions sahariennes de Tunisie. Une étude de la dynamique de ses populations est en cours de réalisation en Tunisie du sud (Ben Farjallah en cours).

### 3.4.2. Classification systématique

Selon la Flore Medcheclist (Greuter & al 1981-1989) et le catalogue de Dobignard et Chatelain (2010), la position systématique d'*Ephedra alata-alenda* est la suivante:

Classification phylogénétique	
Ordre	<i>Ephedrales</i>
Famille	<i>Ephedraceae</i>
Genre	<i>Ephedra</i>
Espèce	<i>alata</i>
<i>Sous espèce</i>	<i>alenda</i>



**Planche 4:** Port général d'*Ephedra alata - alenda* (Stapf) Batt. & Trab ; rameau fleuri (B) et fleur en épanouissement (C).

### 3.5. *Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut

#### 3.5.1. Description botanique & Ecologie

Selon Raunkiaer (1934), *Euphorbia guyoniana* est un hémicryptophyte, à port herbacé et très rameux (Planche 5). Les tiges élancées et dressées sont très ramifiées dès la base. Elles contiennent du latex, et peuvent atteindre jusqu'à 1 m de hauteur, notamment dans les situations dunaires, bien arrosées par les eaux de ruissellement. Les feuilles sont très petites, linéaires et alternes, se desséchant rapidement. Il s'agit d'une plante puissante à souche souterraine, longuement traçante, et dont le système racinaire est très bien ramifié,

traçant et souvent très superficiel. Les graines sont sans caroncule, noirâtres et munies de côtes longitudinales grises, glandes de la cyathe arrondies, sans pointe. Les fleurs ont des pétales réduits de couleurs jaune vif. Le fruit est une capsule de 4 à 5 mm, contenant des graines ailées. En milieu dunaire, cette espèce tend à envahir les petites formations dunaires des zones désertiques. Au dessèchement de toute la partie aérienne, la reprise de la croissance se fait durant la saison suivante, à partir des bourgeons enterrés dans le sol. Au niveau écologique, *Euphorbia guyoniana*, est une espèce strictement désertique. Son apparition indique là où elle existe un climat méditerranéen saharien. Comme pour le reste des espèces du genre *Euphorbia*, elle ne présente aucun intérêt pastoral.

### 3.5.2. Classification botanique

Selon la Flore Medcheclist (Greuter & al 1981-1989) et le catalogue de Dobignard et Chatelain (2010), la position systématique d'*Euphorbia guyoniana* est la suivante:

Ordre : Euphorbiales  
Famille : Euphorbiaceae  
Sous famille : Euphorbioideae  
Tribu : Euphorbieae  
Genre : *Euphorbia*  
Espèce : *guyoniana*



**Planche 5:** *Euphorbia guyoniana* : Port de l'espèce (A), tige fleurie (B), détail d'une fleur (C).

### 3.6. *Helianthemum confertum* Dunal

#### 3.6.1. Description botanique et écologie

Il s'agit d'un petit arbuste exclusivement saharien. Sa hauteur excède rarement 2 m, avec un tronc parfois bien développé, notamment dans les situations où l'espèce n'est pas pâturée (Planche 6). Les feuilles sont de forme oblongue et elliptique, avec des bords révolutés. Elles sont le plus souvent couvertes de poils étoilés, attestant l'importante adaptation écophysio­logique de cette espèce saharienne. Les fleurs sont le plus souvent sessiles, groupées en épis terminaux ou axillaires. Les pétales sont de couleur jaune vif et bien visibles. Les sépales intérieurs sont ovales ou ovales lancéolés, et couverts d'une pubescence étoilée, avec, sur les nervures, de longs poils blancs. Leur face interne est tapissée de soies apprimées. Le fruit est une capsule développée, plus courte que les sépales, entourés par le calice en cloche. Au niveau écologique, ce taxon occupe les sables désertiques de la Tunisie méridionale. Ainsi, on le rencontre dans l'extrême sud du pays. Au niveau biogéographique, ce taxon est abondant dans le Sahara septentrional de la Tunisie, du Maroc et de l'Algérie.



**Planche 6** : Rameaux feuilles et fleurs *d'Helianthemum confertum*

#### 3.6.2. Classification systématique

<b><u>Ordre</u></b>	<u>Malvales</u>
<b><u>Famille</u></b>	<u>Cistaceae</u>
<b><u>Genre</u></b>	<u><i>Helianthemum</i></u>
<b>Espèce :</b>	<u><i>confertum</i></u>

### 3.7. *Henophyton deserti* Coss. & Durieu

#### 3.7.1. Description botanique et écologie

Anciennement appelée *Oudneya africana*, cette espèce a un port buissonnant avec des tiges de couleur blanchâtre glabres et très rameuses. Les feuilles sont allongées et en forme de spatule. Elles sont partiellement charnues, alternes, sessiles et rétrécies à la base. Les fleurs sont de couleur rose ou pourprée. Le fruit est une silique allongée et bosselée, aux bords plus ou moins ondulés, laissant voir les graines disposées sur deux rangs superposés. Les graines sont ailées, ce qui permet leur transport très facile par le vent. Au niveau écologique, selon Ozenda (1977), *Henophyton deserti* est un taxon qui colonie les steppes désertiques de l'Afrique du Nord. Sur le plan pastoral, cette espèce est présente une bonne valeur pastorale, pour les dromadaires, et même par les petits ruminants (Chaieb 1985). En outre, au niveau de la fixation du sable, *H. deserti* est capable d'atténuer le phénomène de l'érosion éolienne.

#### 3.7.2. Classification botanique

Selon la Flore Medchekest (Greuter & al 1981-1989) et le catalogue de Dobignard et Chatelain (2010), la position systématique d'*Henophyton deserti* est la suivante:

#### Classification classique

Classification phylogénétique	
Ordre	<i>Brassicales</i>
Famille	<i>Brassicaceae</i>
Genre	<i>Henophyton</i>
Espèce	<i>Deserti</i>



**Planche 7:** *Henophyton deserti*, port de l'espèce (A), rameau feuillé (B), et fleur (C).

### **3.8. *Motkiopsis ciliate* (Forssk.) I. M. Johnston**

#### **3.8.1. Description botanique et écologie**

Petit chaméphyte (Raunkiaier 1934) généralement 15 à 20 cm, il apparaît surtout sur les petites dunes des régions sahariennes. L'individu est généralement très rameux dès la base, étalant sur le sol ses rameaux à l'aspect blanchâtre du fait de sa pilosité. La plante est hérissée de poils durs et piquants. Les feuilles sont alternes et coriaces. Fleurs en cymes courtes et denses, arquées au début puis se relevant au fur et à mesure de la floraison. Fleurs virant du grenat au rose puis au bleu pâle. Akènes de 2 à 3 mm, luisants et brun-clair. La floraison a lieu généralement au printemps, et les fleurs de couleur violacée à leur apparition, deviennent avec l'âge blanches.

#### **3.8.2. Classification botanique**

Familia: *Boraginaceae*

Subfamilia: *Boraginoideae*

Genus: *Motkiopsis*

Species: *ciliata* (Forssk.) I. M. Johnst.



**Planche 8** : Individu de *Moltkiopsis ciliata* (A), rameau fleuri (B) et détail des fleurs (C).

### 3.9. *Spartidium saharae* (Coss.) Pomel

#### 3.9.1. Description botanique & écologie

Il s'agit de l'une des rares phanérophyles du milieu saharien. On y observe des longs rameaux, avec des feuilles unifoliées, étroites et réduites en écailles. Ces feuilles sont caduques, et le rôle de la photosynthèse est joué par les rameaux photosynthétiquement actifs. Les fleurs apparaissant au printemps, sont espacées le long des rameaux. Les pétales ont une couleur jaune foncée et leur durée de vie est généralement courte, notamment une fois que la fécondation est achevée. Le fruit est une gousse longue, à paroi parcheminée. Ce taxon apparaît sur les sols sableux des zones continentales (Le Houérou, 1959).

Au niveau écologique *S. saharae* colonise les zones sableuses profondes en milieu saharien continental. Au stade jeune, les plantules, sont généralement vulnérables vis-à-vis du stress hydrique, notamment durant les saisons du printemps et de l'été. Au niveau pastoral, cette espèce est très appréciée par les animaux sauvages et domestiques. Outre sa qualité pastorale, cette espèce est fixatrice de sable, et donc susceptible d'aider à la lutte contre la désertification. Cette espèce est en outre réputée comme étant fixatrice d'azote, ce qui contribue au maintien de la fertilité du sol (Belsky et al., 1993).

#### 3.9.2. Classification systématique

Selon la Flore Medcheklist (Greuter & al 1981-1989) et le catalogue de Dobignard et Chatelain (2010), la position systématique de *Spartidium saharae* est la suivante:

Ordre: Fabales  
Famille: *Fabaceae*  
Sous famille: *Faboideae*  
Genre: *Spartidium*  
Espèce: *saharae*



**Planche 9 :** *Spartidium saharae* (Individu et rameau fleuri).

## CHAPITRE II : PHYTOCHIMIE & ACTIVITÉ BIOLOGIQUE

### 1. Introduction

La flore tunisienne dont plus de deux milles espèces furent inventoriées (Le Floch & Boulos 2010) est depuis longtemps réputée pour son large usage en pharmacopée traditionnelle (Le Floch 1983). Cet intérêt pour la médecine traditionnelle est toujours croissant. Il en est de même pour l'expérimentation scientifique qui à travers le monde, a pris ce dernier temps, un essor vertigineux et qui a permis d'isoler plusieurs substances d'origines naturelles et de leur trouver des vertus thérapeutiques. C'est le cas de l'Aspirine (acide acétyl salicylique) isolé initialement des feuilles et des écorces de *Salix alba* L. (*Salicaceae*) (Colegate et Molyneux, 1993), de la Galegine (agent antihyperglycémiant) isolé de *Galega officinalis* L. (*Fabaceae*). D'ailleurs la Galegine a à ce propos servi de modèle de synthèse de la Metmorfin et d'autres médicaments antidiabétiques (Sneider, 1985). A l'heure actuelle, d'autres équipes de chercheurs obtiennent à partir des plantes médicinales, des substances nécessaires à la création de nouveaux médicaments. Parmi ces plantes, nous pouvons citer *Mansonia altissima* (*Sterculaceae*), dont la mansonine demeure le principal composé purifié pouvant être utilisé dans le traitement des affections cardio-vasculaires (Guédé-Guina *et al*, 1992 et 1998).

Cependant, le potentiel des espèces végétales, comme sources pour la production de nouveaux médicaments est largement inexploité (Hamburger et Hostettmann, 1991) eu égard au nombre d'espèces de végétaux supérieures (*Angiospermae* & *Gymnospermae*) sur la planète estimé à plus que 250.000 taxons (Kong *et al.*, 2003). En effet, sur ce nombre, seulement 6% ont été testés pour leur activité biologique et 15 % ont été évalués sur le plan phytochimique (Verpoorte, 2000).

Notre contribution à cet effort international de la recherche pharmacognosique, portera sur un ensemble de neuf (09) espèces végétales de la flore terrestre nord-africaine et ayant une écologie strictement saharienne. Le choix de ces espèces émane d'une part de leur réputation en médecine traditionnelle, et d'autres parts de leur incontestable richesse en métabolites secondaires, susceptible d'être valorisée en pharmacologie. Il faut toutefois reconnaître que de nos jours, en Afrique en général et en Afrique du nord en particulier, les populations nomades sont de plus en plus confrontées à la résurgence de nouvelles pathologies, dont on cite en entre autres, les maladies liées au stress oxydant. En effet, le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications. La plupart

des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la multiplication mitochondriale de radicaux (Girodon *et al.*, 1997; Sohal *et al.*, 2002). Le stress oxydant est la principale cause initiale de plusieurs maladies (Mates et Sanchez-Jimenez, 2000). C'est le facteur potentialisant l'apparition des maladies plurifactorielles telles que le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (Sergeant *et al.*, 1998). Aussi, compte tenu de la diversité et la gravité des maladies induites par le stress oxydant, plusieurs équipes de chercheurs se sont investis dans la recherche de nouveaux antioxydants en vue de lutter contre le stress oxydant et ses pathologies associées.

Les espèces végétales sahariennes, par leurs caractéristiques phytochimiques et leurs possibles activités biologiques, pourront constituer des sources de nouvelles molécules, à effets antioxydant, et plus particulièrement anticancéreux et cytotoxiques. C'est dans ce cadre rappelons-le, que se situe notre étude relative à ce patrimoine végétal saharien.

## **2. Valorisation et intérêt biologique des espèces étudiées**

### **2.1. *Anthyllis henoniana***

En ce qui concerne la composition chimique d'*Anthyllis sericea*, récolté de la zone aride de la Tunisie, des teneurs élevées en minéraux ont été constatées. Ainsi, Selmi & Ferchichi (2010), ont dosé des vitamines et des macro- minéraux comme : Mg, Ca, Na, K. En revanche, ces auteurs constatèrent des faibles teneurs en Cu, Fe et Zn au niveau de ce taxon. D'autres parts, divers chercheurs ont abordé les niveaux d'éléments essentiels, et non essentiels au niveau du Genre *Anthyllis*. Cependant, l'espèce *henoniana*, typiquement saharienne est peu ou pas connue, notamment pour ses vertus thérapeutiques. Des analyses chimiques réalisées par Khadem & Marles (2010), ont permis de constater la présence de l'éther 4-méthyl qui se trouve dans les feuilles et les tiges d'*Anthyllis sericea*. Adell & al (1988) et Alberto & al (1989) ont constaté des fortes teneurs de cette espèce en flavonoïdes glucosides. Par ailleurs, en dépit de sa richesse phytochimique, *A. henoniana*, n'est pas réputé par son usage en médecine traditionnelle. Notre travail permettra probablement d'élucider certaines de ses vertus, et par conséquent la possibilité de sa valorisation pharmacognosique future.

## **2.2. *Centropodia forskalii***

Anciennement appelée *Danthonia forskahlii*, cette espèce n'a presque pas fait l'objet d'études préalables de ses activités biologiques. En effet, étant rarissime, même en zone saharienne, *C. forskalii*, apparaît durant une faible période de l'année, notamment durant les années pluvieuses, aussi rares, en zones sahariennes. Selon Le Floch (1983), aucun usage n'est connu en médecine traditionnelle pour cette espèce. Cependant, cet auteur signale son effet abortif, notamment pour la Gazelle des dunes (Gazelle leptocère).

## **2.3. *Cornulaca monacantha***

*Cornulaca monacantha* Del. pousse sur des sols sableux et caillouteux, c'est un arbuste complexe bleu-vert, avec des feuilles courtes, incurvées, effilées à partir d'une base d'accrochage dans une colonne vertébrale rigide. Les petites fleurs verdâtres, sont épineuses. Le fruit est un akène. La floraison a lieu en automne. Il est distribué dans le désert égyptien du Sinaï, les régions côtières de la Méditerranée orientale et l'oasis du désert occidental (Tackholm, 1974).

Les parties aériennes de *Cornulaca monacantha* contiennent des gallotannins nouvellement identifiés: Monacanthin A et B (Kandil et al., 2001). Deux flavonoïdes connus, lutéoline-7-O-rhamnoside, lutéoline-7-O-glucoside, et deux gallotannins connus, penta-O-galloyl-β-D-glucose et de 1,2,3,6-tétra-O-galloyl -β-D-glucose ont aussi été isolés (Kandil et al., 1998), également des saponines triterpénoidales (Kamel et al., 2000) et triterpènes (Amer et al., 1974) (Dawidar et al., 1981) (Al-jaber et al., 1991).

## **2.4. *Ephedra alata-alenda***

*Ephedra alata-alenda* Decne est une gymnosperme qui appartient à la famille des *Ephedraceae*. C'est un arbuste vivace et il est un sable-liant très efficace (Wafa'a et al., 2010), est l'un de la gamme la plus ancienne et herbes médicinales dans le monde (Abourashed et al., 2003)

Cet arbuste est rigide, jaune-vert, densément ramifié, 40-100 cm de hauteur et souvent plus large que haut. Les rameaux sont striés. Les cônes sessiles et regroupés dans l'aisselle (Mandaville, 1990). Il est un liant de sable très efficace et résiste à la désertification (Abdallah et Chaieb, 2007).

Éphédra a été considérée depuis longtemps en tant que source importante d'alcaloïde : éphédrine, un médicament vasoconstricteur, autrefois, très utilisé dans le traitement de l'asthme et comme décongestionnant respiratoire générale (Mandaville, 1990).

Beaucoup d'alkaloïdes, lignanes et composés phénoliques ont été isolés à partir d'*Ephedra alata* (Nawwar et al., 1985). Autres flavonoïdes ont été étudiés: deux nouveaux glucosides de flavonol ont été identifiés dans cette plante: 8-Me herbacétine éther 3-O-glucoside-7-O-rutinoside et herbacétine 7-O-(6'' - quinynglucoside) ajoutés à flavonoïdes connue : vicenin 2, 3 lucenin, le kaempférol 3-rhamnoside, quercétine 3-rhamnoside et herbacétine 7-glucoside (Nawwar et al., 1984). *Ephedra alata* contient des quantités considérables d'éphédrine, 7,54 g. par kg. dans les branches sèches, 0,88 dans les racines (Peronnet et Chatin., 1942) et de ephedrone (Nawwar et al., 1985).

Le dépistage antiviral montre qu'*Ephedra alata* a une activité antivirale contre le HSV (Rf 10 (4)). (Soltan et Zaki., 2009). En outre, l'activité antidiabétique a été rapportée (Shabana 1990), par l'identification de nouveaux dipeptidyl humain inhibiteurs peptidase-IV d'origine naturelle (Partie II) qui sont un des candidats potentiels pour le traitement du diabète de type 2 (Guasch et al., 2012). Cette plante peut servir de sources d'antioxydants avec de nouveaux chémotypes (Alali et al., 2007). Selon Le Floc'h (1983), les fruits et les bourgeons de cette espèce, étant astringents, sont employés en médecine.

## **2.5. *Euphorbia guyoniana***

S'agissant d'une endémique saharienne, *Euphorbia guyoniana* est une plante qui se développe sur les Terrains ensablés du désert (Quezel et Santa, 1963). Le genre *Euphorbia* est le plus représentatif de la famille des Euphorbiacées (Ozenda, 1991). Ces plantes sont connues pour la présence de latex qui possède un effet irritant sur les yeux et la peau (Bellakhdar, 1997). Elles ont été utilisées dans la médecine traditionnelle pour traiter les maladies de la peau, les migraines, les parasites et les verrues intestinales (Singla et Pathak, 1990). En outre, les plantes de ce genre sont connues pour leur importante teneur en métabolites secondaires. La présence de types particuliers de diterpènes (Shi et al., 2005), des dérivés macrocycliques, polycycliques (Redei et al., 2003) et aromatiques (Oksuz et al., 2002), triterpènes (Lima et al., 2003), des stéroïdes (Tanaka et al., 1999), des composés alcaloïdes et des flavonoïdes (Boudiar et al., 2010), expliquent les activités biologiques de ce genre, notamment antitumorale, antivirale, différents effets vasculaires et des propriétés cytotoxiques (Appendino et al., 2002 ; Heba et al., 2007; Hohmann et al., 2001). Deux nouveaux polyesters de diterpène avec jatrophone ont été isolés à partir des parties aériennes de *E. guyoniana* (Ahmed et al., 2006, Kúsz et al., 2016). Ils sont considérés comme des inhibiteurs puissants (Corea et al., 2003; Jassbi, 2006). Ces composés présentent une cytotoxicité contre les cellules human embryonic kidney 293

(HEK293) avec des valeurs IC50 de 35-100 uM (Hegazy et al., 2010). Selon Le Floc'h (1983), le latex de cette plante est utilisé pour soigner les morsures de vipères et les piqûres de scorpions.

## **2.6. *Helianthemum confertum* :**

L'étude des propriétés antioxydantes de l'extrait n-butanol d'*Helianthemum confertum*, a été réalisée in vitro en utilisant des méthodes de spectrophotomètre (Djebbari et al 2015). Ayant déterminé les activités antioxydantes par DPPH, ces auteurs montrent que l'extrait d'*Helianthemum confertum* contenait une quantité importante de polyphénols et flavonoïdes et présentait une activité antioxydante. Ces auteurs ajoutent que cette espèce a des composés prometteurs à tester en tant que médicaments antioxydants potentiels pour le traitement de maladies résultant du stress oxydatif. Le Floc'h (1983), signala aussi une activité anti radicalaire de cette espèce. Cependant, il n'évoquait aucun usage en médecine traditionnelle de ce taxon, dans toute l'Afrique du Nord

## **2.7. *Henophyton deserti* :**

*Henophyton deserti* Coss. et Durieu, synonyme *Oudneya Africana* R. Brown, est une plante endémique du sahara de la famille de *Brassicaceae ex. Cruciferae*. Cet arbuste a une réputation de tolérance élevée à la carence en eau dans les régions sahariennes tunisiennes (Chaieb et Boukhris, 1998). Peu de recherches expérimentales ont été effectuées sur les réponses de germination de cette espèce et les données disponibles sont concernées par les descriptions de ses caractéristiques, la taxonomie et de l'habitat (Le Houérou, 1969). Les graines et les feuilles de cette plante sont généralement préparées et utilisées pour traiter les problèmes digestifs, l'arthrite, le rhume et la grippe, la fièvre, l'irritabilité et les piqûres de scorpion (Le Floc'h, 1983) (Bouhadjera et al., 2005).

Récemment, cette espèce a été étudiée pour ses propriétés chimiques, sa composition, l'activité potentielle antimicrobienne et antioxydante (Stocker et al., 2005). Quatorze composés ont été identifiés par LC / MS, GC / MS et GC dans des extraits de feuilles et de graines (Derbel et al., 2010). Cette plante a montré une teneur en composés phénoliques, une puissante activité antioxydante et antimicrobienne. Ces plantes peuvent servir de sources d'antioxydants avec de nouveaux chémotypes avec des propriétés bénéfiques pour la santé (Bouaziz et al., 2009). Selon Le Floc'h (1983), cette espèce est souvent utilisée en médecine traditionnelle, notamment

pour ses feuilles ses feuilles qui peuvent cicatriser les plaies.

### **2.8. *Moltkiopsis ciliata* :**

*M. ciliata* de Synonyme *Lithospermum ciliatum* est peu connue au niveau de sa phytochimie. En effet par son caractère épineux, cette espèce saharienne ne semble pas constituer un intérêt pharmacologique pour les populations sahariennes. Néanmoins, en zone à climat tempéré, certaines espèces et sous-espèces du genre *Lithospermum* { syn : du Genre *Moltkiopsis*}, semblent être utilisés à des fins d'ornementations.

Nos recherches réalisées sur ce taxon, constitueront certainement un acquis pour la science, et élucideront les vertus de cette espèce typiquement saharienne.

### **2.9. *Spartidium saharae* :**

D'après la littérature, les travaux phytochimiques effectués sur le genre *Genista*, auquel appartenait l'actuel genre de *Spartidium*, furent particulièrement consacrés à l'isolement d'alcaloïdes, et de flavonoïdes notamment les isoflavonoïdes. En outre, les recherches bibliographiques menées sur l'intérêt biologique des espèces du genre *Spartidium* montrent peu d'investigations réalisées dans ce domaine, et plus particulièrement le cas de *Spartidium saharae*, espèce localisée dans les contrées les plus sahariennes d'Afrique du Nord, notamment la Tunisie & l'Algérie. Par ailleurs, ces travaux ont pu mettre en évidence quelques intérêts pharmacologiques dont on peut citer, l'étude faite par Harionov (1988), qui montra :

que les extraits flavoniques des deux plantes médicinales, *G. tinctoria* et *G. sessilifolia* ne sont pas toxiques à des doses  $\leq 2000$  mg/Kg.

Aucune action oestrogénique ni androgénique n'a pu être mis en évidence pour une dose de 100 mg/Kg.

le mélange flavonique de *G. sessilifolia* a une forte action anabolique et anti-inflammatoire alors que celui de *G. tinctoria* ne montre aucune action.

Une autre étude réalisée par Korpachov et ses collaborateurs (1995) sur la fonction de la thyroïde a pu montrer que l'extrait flavonique de l'espèce médicinale *G. tinctoria* provoque une augmentation de la thyroxine de 19 à 31% chez les rats sains pour une dose de 20 à 60 mg/Kg et garde un niveau normal chez les rats hypothyroïdiens. Des études de digestibilités « in vitro » ainsi que la composition chimique de *Spartidium saharae*, réalisées par Boufennara et al.

(2012), montrent que cette espèce est bien riche en composés phénoliques et en flavonoïdes. En dépit de cette richesse, l'espèce est bien appréciée par la faune sauvage, ainsi que par le dromadaire.

### **3. Conclusions**

Les recherches bibliographiques que nous avons réalisées sur les aspects phytochimiques, et les activités biologiques de l'ensemble des espèces retenues, mettent en évidence des différences entre-elles quant à la disponibilité des informations ciblées. En effet, bien que des espèces comme *Euphorbia guyoniana*, *Ephedra alata-alenda* ou *Henophyton desertii* soient connues tant sur le plan phytochimique que biologique, il y'a lieu de signaler que l'intérêt biologique des espèces comme *Centropodia forskalii* ou *Moltkiopsis ciliata* soit peu ou pas connu. Les investigations prévues sur ces espèces dans le cadre de ce travail, apporteront incontestablement des informations utiles à la valorisation pharmacologique de ces ressources phytogénétiques sahariennes. En outre, les intérêts prévisibles de l'usage de ces espèces, aideront les populations locales sahariennes, le plus souvent isolées, à une meilleure valorisation médicinale de ces ressources autochtones.

# CHAPITRE III : MÉTHODOLOGIE & EXPÉRIMENTATIONS REALISÉES

## 1. Collecte du matériel végétal

### 1.1. Sites de collecte : Climat et géographie

Durant le printemps 2013, une expédition regroupant le Professeur Mohamed Chaieb, Le Dr Blaise Touzard et moi-même fut réalisée dans les régions sahariennes de l'Afrique du Nord, et plus précisément en Tunisie du sud. L'objectif de l'expédition a été une tournée sur le terrain, dans un premier temps, en vue de la reconnaissance de la région, de ses écosystèmes et ses particularités biologiques, notamment la flore et végétation. Dans un second temps, notre objectif a été la récolte des espèces végétales sahariennes, en vue de l'étude de leur activité biologique. Cette expédition fut pour moi une véritable découverte, dans la mesure où je n'avais auparavant qu'une idée très globale sur les régions sahariennes. Aussi, au niveau floristique, en dépit de ma formation en botanique pharmaceutique, j'étais plutôt plus familiarisé par une flore totalement différente sur tous les aspects de celle que j'ai pu rencontrer en zone saharienne.

Cette région est donc située au bord du Grand Erg Oriental, et se caractérise par un bioclimat méditerranéen saharien, où la pluviométrie annuelle moyenne est inférieure à 100 mm. La température est généralement élevée surtout pendant la saison estivale, où elle peut atteindre parfois 50°C à l'ombre. Durant la nuit, la température peut descendre au-dessous de zéro °C ; la neige et la glace sont très rares au Sahara: la gelée blanche y est courante. Le déficit hydrique et la sécheresse, répartis sur une longue période de l'année (neuf mois par an), constituent des phénomènes très couramment observés dans ces régions sahariennes. Le vent chaud et sec, en provenance du Sahara et couramment appelé sirocco, est fréquent à partir du mois de mars, s'étalant sur au moins 6 mois dans l'année. L'ensemble de ces conditions météorologiques est susceptible d'influer sur la composition chimique des espèces végétales, en particulier au niveau la nature et la quantité des métabolites secondaires qu'elles contiennent. En ce qui concerne les sites de collecte, nous avons particulièrement récolté nos espèces dans les régions du sud-ouest de la Tunisie méridionale. Il s'agit plus exactement des zones de Tozeur et de Kébili (figure 5), faisant partie des régions naturelles du Djerid, Nefzaoua et Gherib au sens de Le Houérou (1959). Ces régions sont aussi situées de part et d'autres du Chott Djerid. La collecte du matériel végétal a été réalisée essentiellement dans 4 sites différents. Deux sites sont situés

au nord du Chott, s'agissant de Nefta et de Hazwa, et deux sites sont situés au sud du chott, s'agissant du site d'El Fawar et du site de Bir Soltane.

### 1.1.1. Site de Nefta

C'est un site localisé au niveau de la région naturelle du Jerid. Il se situe au sud-ouest de la Tunisie, et est rattaché administrativement au gouvernorat de Tozeur. Au niveau pédologique, ce site se caractérise par un milieu sablo-gypso-calcaire, surmonté par un petit horizon d'accumulation sableuse. La végétation est essentiellement formée par des petits chaméphytes et ligneux bas (planche 10). Au sein de ce site, nous avons récolté des individus de *Cornulaca monacantha* et de *Moltkiopsis ciliata*.



**Planche 10** : Paysage caractéristique du site de Nefta.

### 1.1.2. Site de Hazwa

Ce site est également localisé dans le Gouvernorat de Tozeur, et est limitrophe des frontières tuniso-algériennes. Il se caractérise par un bioclimat de type saharien. Au niveau géomorphologique, ce site est marqué par la présence d'un champ de dunes sableuses, de hauteur pouvant atteindre 10 m. La végétation naturelle est particulièrement composée d'une steppe sableuse mobile, dominée par *Stipagrostis pungens* (planche 11). Dans ce site nous avons récolté les espèces suivantes : *Centropodia forskalii*, *Helianthemum confertum* et *Spartidium saharae*.



**Planche 11** : Paysage caractéristique du site de Hazwa.

### 1.1.3. Site d'El Fawar

Ce site est aussi marqué par un climat saharien. La moyenne annuelle des précipitations est de 58,7 mm, la température maximale est de 43.8°C. La température minimale est de 4.2°C. Les vents constituent l'un des éléments déterminants de cette région par leur force qui peut dépasser 110 km/h, avec une nette fréquence du sirocco. Au niveau

pédologique le sol, est majoritairement de texture sableuse, grossière, très filtrante. On souligne également l'abondance des champs de dune mobile, notamment sous l'action du vent fréquent. La végétation est une steppe saharienne très claire, et peu dense en espèces végétales (planche 12). Le peuplement végétal est particulièrement structuré par *Ephedra alata-alenda*.



**Planche 12:** Morphologie du paysage du site d'El fawar

#### **1.1.4. Site de Bir Soltane**

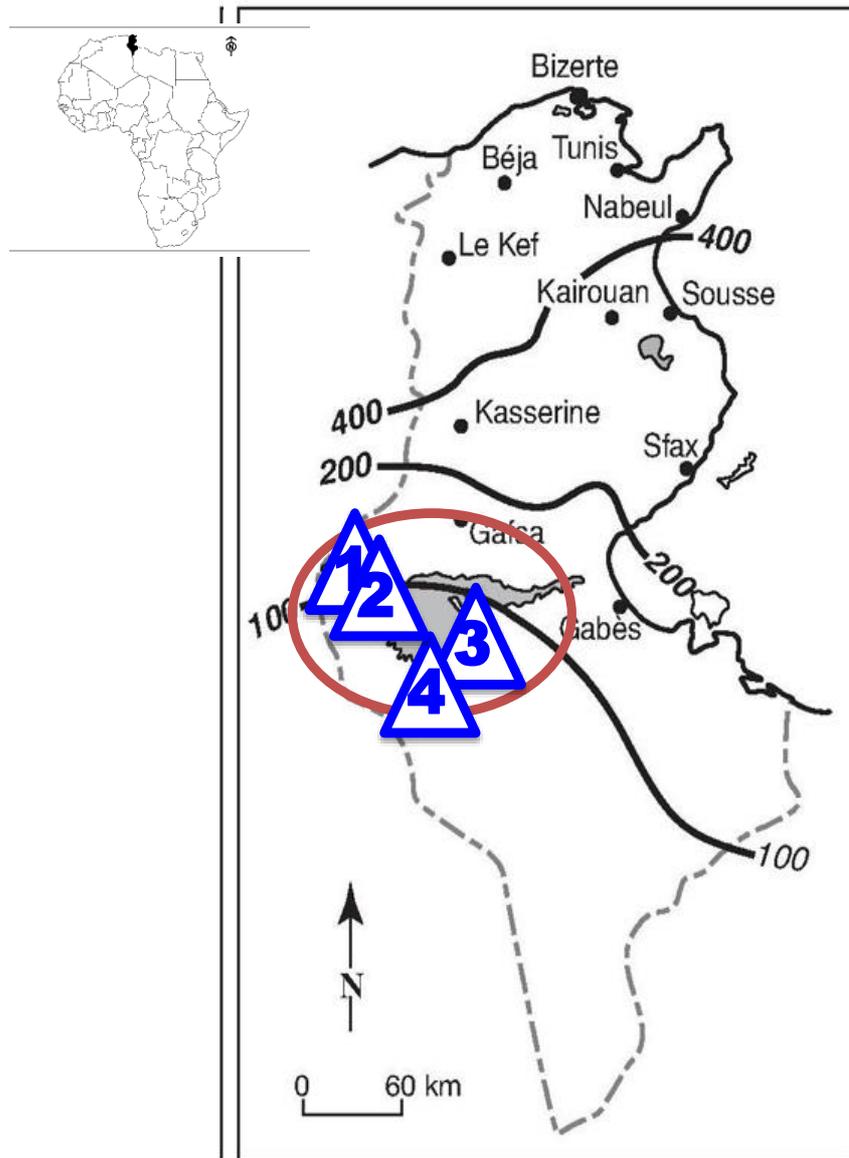
Ce site est situé en pleine région saharienne de Tunisie, et plus précisément au sud de Chott Djerid. La région de Bir Soltane est dépourvue de Station météorologique. Les données climatiques obtenues à partir de la station météo ksar Tarcine située à 12 km au sud-est du site, révèlent une moyenne annuelle des précipitations de 75 mm. La température maximale est de 40.8°C. La température minimale durant la saison de l'hiver est de 5°C. Au niveau géomorphologique, ce site est également caractérisé par la présence de champs dunaire de sable

mobile, où les conditions de la vie sont très précaires. (Planche 13). Dans cette station, nous avons récolté les espèces suivantes : *Anthyllis henoniana*, *Henophyton desrti* et *Euphorbia guyoniana* .



**Planche 13** : Géomorphologie du site de Bir soltane. (Individus d'*Euphorbia guyoniana*, en plein développement durant la saison printanière.

Sur la carte qui suit (Figure 5), nous présentons la localisation géographique des différents sites d'études. On remarque bien la localisation de l'ensemble des sites au niveau de l'isohyète moyenne de 100 mm.



**Figure 5 :** Localisation géographique de la région saharienne de collecte des espèces végétales (cercle rouge). 1 : site de Nefta ; 2 : site de Hazwa ; 3 : site d'El Fawar ; 4 : site de Bir Soltane.

Aussi, pour de plus amples détails, nous rapportons sur le tableau 3 qui suit, des caractéristiques biologiques écologiques et géographiques des sites d'études.

**Tableau 3:** Résumé des caractéristiques biologiques et écologiques des espèces étudiées

Espèce	Famille Botanique	Forme de la vie (Raunkiaier 1937)	Sites de collecte	Type de bioclimat	Type de sol	Coordonnées GPS
<i>Anthyllis henoniana</i>	<i>Fabaceae</i>	Chamaephyte	Bir	Bioclimat méditerranéen saharien	calcaire gréseux	33.3668 N 8.6346 E
			Soltane			
<i>Centropodia forskalii</i>	<i>Poaceae</i>	Hemicryptophyte	Hazwa		sableux profonds	33.9208 N 8.0986 E
<i>Cornulaca monacantha</i>	<i>Chenopodiaceae</i>	Chamaephyte	Nefta		sandy limestone Gypso	33.9225 N 8.098611 E
<i>Ephedra alata alenda</i>	<i>Ephedraceae</i>	Nano-Phanerophyte	El Fawar		sableux profonds	33.3734 N 8.7234 E
<i>Euphorbia guyoniana</i>	<i>Euphorbiaceae</i>	Hemicryptophyte	Bir solane		sableux profonds	33.3735 N 8.7237 E
<i>Helianthemum confertum</i>	<i>Cistaceae</i>	Chamaephyte	Hazwa		Sol Gypso-sable	33.7437 N 7.59.43 E
<i>Henophyton deserti</i>	<i>Brassicaceae</i>	Chamaephyte	Bir Soltane		calcaire gréseux	33.3668 N 8.6346 E
<i>Moltingopsis ciliata</i>	<i>Boraginaceae</i>	Chamaephyte	Nefta	Sablo-gypso-calcaire	33.494817 N 9.4608 E	
<i>Spartidium saharae</i>	<i>Fabaceae</i>	Nano-Phanerophyte	Hazwa	sableux profonds	33.7437 N 7.59.43 E	

## **1.2. Collecte et préparation des échantillons végétaux**

Au cours de notre expédition sur le terrain, nous avons procédé à la collecte du matériel végétal de l'ensemble des espèces retenues pour cette étude. Rappelons que la récolte a été faite durant la saison du printemps 2013, correspondant à la pleine croissance de l'ensemble de ces espèces saharo-méditerranéennes. En outre, on estime que durant cette période de la croissance phénologique, les espèces présentent une richesse qualitative et quantitative en métabolites secondaires. Ainsi, pour chaque espèce, nous avons récolté les différents organes aériens de l'individu : feuilles, rameaux, fleurs et fruits. L'exception a cependant été faite pour *Helianthemum confertum*, où en plus des organes aériens, nous avons également prélevé les organes souterrains, (partie racinaire).

Ainsi, pour chaque espèce, les échantillons prélevés, ont été placés dans des sachets en plastique, numérotés et scellés. Les échantillons ont été ramenés au Laboratoire, où ils ont été lavés puis séchés à l'air libre et à l'ombre durant 21 jours. Après séchage, ces échantillons ont été récupérés, stockés dans des bocaux fermés hermétiquement et placés à l'abri de la lumière et de la chaleur avant leur utilisation.

Après séchage total, tous les échantillons ont été broyés et préparé en vue de l'étape suivante d'extraction.

## **2. Expérimentations réalisées**

### **2.1. Essais anticancéreux et antimicrobiens**

#### **2.1. 1. Matériel végétal**

Rappelons que les plantes sur lesquelles nous avons travaillé, ont été collectées au printemps de 2013 des régions sahariennes tunisiennes. Au cours de notre travail, nous avons étudié la partie aérienne de toutes les plantes, à l'exception d'*H. confertum*, dont nous avons étudié les deux parties, souterraine et aérienne. Un spécimen de chaque espèce a été déposé au Département de pharmacognosie, Université de Szeged, Hongrie (Tableau 4).

**Tableau 4 :** Liste des espèces végétales et types d'organes criblés dans cette étude.

<b>Espèce végétale</b>	<b>N° Spécimen</b>	<b>Famille</b>	<b>Partie testée</b>
<i>Anthyllis henoniana</i> (Coss.)	827	<i>Fabaceae</i>	Aérienne
<i>Centropodia forskalii</i> (Vahl.)	829	<i>Poaceae</i>	Aérienne
<i>Cornulaca monacantha</i> (Delile)	835	<i>Amaranthaceae</i>	Aérienne
<i>Ephedra alata</i> var. <i>alenda</i> (Stapf.) Trabut	831	<i>Ephedraceae</i>	Aérienne
<i>Euphorbia guyoniana</i> (Boiss.&Reut.)	832	<i>Euphorbiaceae</i>	Aérienne
<i>Helianthemum confertum</i> (Dunal)	828	<i>Cistaceae</i>	aérienne et souterraine
<i>Henophyton deserti</i> (Coss.&Durieu)	830	<i>Brassicaceae</i>	Aérienne
<i>Moltkiopsis ciliata</i> (Forssk.)	833	<i>Boraginaceae</i>	Aérienne
<i>Spartidium saharae</i> (Coss.&Durieu)	834	<i>Fabaceae</i>	Aérienne

### 2.1.2. Extraction du matériel végétal

L'extraction est réalisée par macération sur 20 g de la poudre végétale, avec 200 mL du mélange éthanol/eau (v/v : 50/50). Après 24h d'incubation, le mélange est filtré, l'éthanol est éliminée à l'aide d'un rotavapor ( $T^{\circ}=40^{\circ}\text{C}$ ) et l'eau par sublimation à l'aide d'un lyophilisateur. L'extrait sec obtenu est conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$  pour étude des activités biologiques.

### 2.2. Etude de l'activité antibactérienne:

Cette étude a été menée avec un total de 18 souches bactériennes, dont huit souches Gram-positif [*Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Citrobacter freundii* (ATCC 34015), *Enterococcus faecium* (QC 2008), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Streptococcus agalactiae* (ATCC 13813), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 49619), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19613)], et dix souches Gram-négatif [*Acinetobacter lwoffii* (ATCC 44 677), *Enterobacter cloacae* (ATCC 45268), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Hemophilus influenzae* (10211), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Moraxella catarrhalis* (ATCC 25238), *Proteus mirabilis* (HNCMB 60076), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella enteritidis* (HNCMB 10092), *Shigella sonnei* (ATCC 25201)].

L'étude a été étendue sur des souches ayant développé une antibiorésistance à savoir : *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300) testée résistante à la méthicilline

Les souches bactériennes sont cultivées sur gélose Columbia, additionnée de 5% de sang de mouton (COS) dans des plaques ELISA (bioMérieux) à  $37^{\circ}\text{C}$ , pendant 24h. Pour la souche bactérienne *Hemophilus influenzae*, la culture est réalisée sur l'Agar de Cholate additionné de

Polyvitex <sup>TM</sup> (PVX) (bioMérieux)). L'inoculation des cultures est réalisée à partir des cultures mères conservées à 4°C.

### **2.2.1. Test de criblage antibactérien:**

La technique de diffusion par disque a été utilisée pour étudier le pouvoir antibactérien des extraits testés, et ce selon la méthode décrite par Bauer (1966). En effet, à partir d'une concentration bactérienne de 10<sup>8</sup>UFC / ml, nous avons réalisé un tapis bactérien sur des boîtes de pétri, contenant la gélose appropriée pour chaque souche. Ensuite, des disques de papier filtres (stériles) de 6 mm de diamètre préalablement imbibés par 20µL (50mg/mL) de l'extrait végétal dissous dans un mélange eau-éthanol (v/v : 40/60), ont été placés soigneusement sur les boîtes de pétri.

Un extrait composé d'un mélange d'amoxicilline, d'acide clavulanique et de la vancomycine a été utilisé comme témoins positifs. Des témoins négatifs ont été réalisés avec des disques de papier, imprégnés de 20 µl de solvant (eau-éthanol v/v 40/60). Les boîtes de pétri sont par la suite incubées à 37°C pendant 24 h. Les diamètres des zones d'inhibition formées au tour des disques sont mesurés et enregistrés.

### **2.2.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice**

Les concentrations minimales inhibitrices des extraits d'*Ephedra alata* var. *alenda* et *Helianthemum confertum* ont été déterminées selon la méthode de microdilution (Mann & al, 1998). Dans une plaque de 96 puits stériles, 20 µl d'extraits (préparés à des concentrations de 50 et 100 mg/ml dans le DMSO) d'*Ephedra alata* var. *alenda* et de *Helianthemum confertum*, sont dilués dans le milieu Mueller-Hinton. En effet, à partir de ces concentrations, différentes dilutions en cascades ont été réalisées (par le milieu MH) pour obtenir des concentrations finales de 5000 à 4,9 µg / ml et 10000 à 9,7 µg/ml d'extraits de *E. alata* var. *alenda* et *H. confertum*, respectivement. La suspension bactérienne (100 µL) a été ensuite ajoutée aux puits. Le volume final dans chaque puits était de 200 µL. Les puits témoins ont été préparés avec du milieu de culture mélangé avec du DMSO, et additionnée de la suspension bactérienne. Les plaques d'ELISA sont par la suite incubées à 37°C pendant 24 h. La CMI est déterminée par observation visuelle de la turbidité. La CMI est la concentration la plus faible d'extraits, ne montrant aucune précipitation de dépôt bactérien au fond de puit. L'expérience a été effectuée deux fois à 3 répétitions.

### 2.2.3. Evaluation de l'activité anti-cancéreuse

Les effets anti-prolifératifs ou anti-cancéreux des extraits végétaux ont été mesurés *in vitro* sur quatre lignées cellulaires humaines : HeLa (col de l'utérus adénocarcinome), A431 (peau carcinome épidermoïde), A2780 (carcinome de l'ovaire) et MCF7 (adénocarcinome du sein). La technique utilisée est la technique de coloration MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium), décrite par Mosmann & al. (1983). Les cellules cancéreuses ont étéensemencées sur une microplaque à 96 puits, et fixées au fond des puits pendant une nuit avant d'ajouter l'extrait testé à des concentrations de 10 ou 30 µg / mL (à partir d'une concentration initiale de 10 mg/mL de DMSO (0,3%)). La DMSO à 0,3% n'exerce aucune action importante sur la viabilité des lignées cellulaires utilisées (Molnar & al 2013). Après incubation pendant 72 h, les cellules vivantes ont été dosées par l'addition de 20 µl de solution MTT (préalablement préparé à 5 mg / ml). Après environ 4 h, le milieu est éliminé par centrifugation, et les cristaux précipités sont dissouts dans 100 µl de diméthylsulfoxyde (DMSO), et incubés sous agitation pendant 1 h. Enfin, l'absorbance est mesurée à 545 nm en utilisant un lecteur de microplaque. Les puits avec des cellules non traités sont considérés comme témoins. Alors que la cisplatine est utilisée comme témoin positif.

Les solutions mères des extraits testés (10 mg / mL) ont été préparées avec du DMSO. Les lignées cellulaires ont été traitées avec des extraits à des concentrations de 10 ou 30 µg / mL.

## 2.3. Essais de toxicité

### 2.3.1. Matériel végétal

Pour ces essais, nous avons utilisé les espèces suivantes :

- Anthyllis henoniana* Coss. *Fabaceae*
- Centropodia forskalii* (Vahl) Cope, *Poaceae*
- Ephedra alata alenda* (Stapf.) Trab., *Ephedraceae*
- Euphorbia guyoniana* Boiss. et Reut., *Euphorbiaceae*
- Helianthemum confertum* Dunal, *Cistaceae*
- Henophyton deserti* (Coss. & Durieu) Coss. & Durieu, *Brassicaceae*
- Spartidium saharae* (Coss. & Durieu) Pomel, *Fabaceae*,

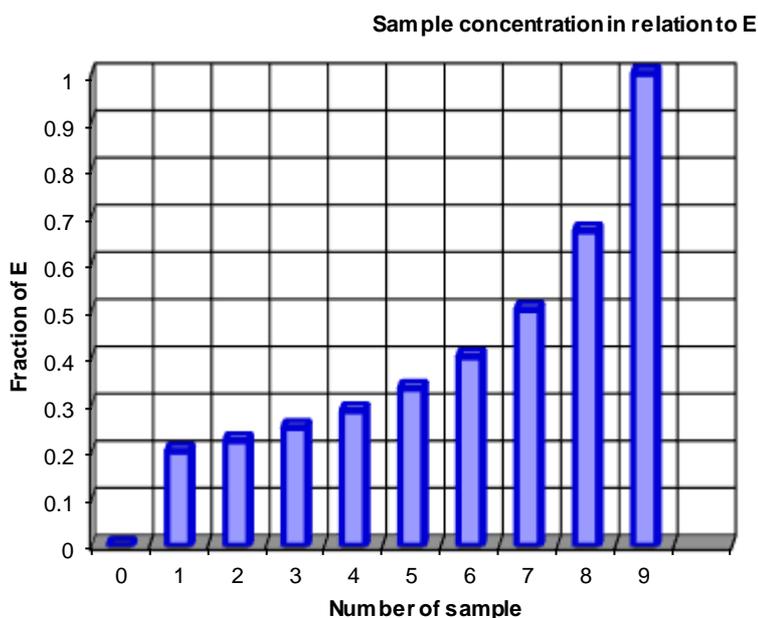
### 2.3.2. Méthode d'extraction

Environ 10g de poudre végétale de chacune des plantes sont imbibés par 0,5 mL d'ammoniaque et extraits par 100 mL de dichlorométhane. Le mélange est incubé 24h à température ambiante. Après filtration, une quantité de 50 ml de chaque extrait est extraite 3 fois par 15 mL d'acide sulfurique, à l'aide de la technique d'extraction liquide-liquide. La phase aqueuse obtenue est alcalinisée par une solution d'ammoniaque puis extraite 3 fois avec le dichlorométhane (45 mL). La phase organique récupérée est concentrée par évaporation rotative. Nous avons réalisé l'expérience avec une série de concentrations, afin de sélectionner les espèces capables d'induire un effet biologique détectable et sans présenter d'effet létal sur les organismes. Les concentrations retenues des parties souterraines d'*Helianthemum confertum*, sont comprises de 0,53 mg / ml à 2,65 mg / ml dans l'eau de mer.

Les larves d'*Artémia*, sont des organismes marins, souvent utilisés dans des essais toxicologiques. Dans nos expériences, leur viabilité a été testée en utilisant des échelles de concentrations obtenues par extrapolation des données émanant des extraits de plantes. La variation de concentration est exprimée par la formule suivante:

$$f(n) = E / (5 - 0.5n)$$

où n est un nombre entier de 0 à 8. En conséquence, on aura neuf échantillons avec des concentrations de E/5 à E, on passe de  $1 / (5 - 0,5n)$ , et numérotés de 1 à 9 (figure 6). Le numéro attribué à l'échantillon standard, et représenté par l'eau de mer, est 0 (zéro).



**Figure 6:** Concentration de l'échantillon par rapport à E

L'idée d'une concentration de la variabilité non-linéaire peut avoir des applications pratiques, et peut même être souhaitable, en cas de la réduction croissante de la dose de solution de dilution. L'inconvénient serait que par l'addition des quantités variables de diluant, il résulte des quantités différentes de solutions. Dans des conditions de laboratoire, cet inconvénient peut être évité en utilisant des quantités variables de "E" standard, précédemment calculées, et diluables au volume désiré. Mathématiquement, les deux variabilités des concentrations, linéaire et non-linéaire, sont correctes. Pour chaque espèce, la valeur numérique de E est représentée dans le tableau ci-dessous (Tableau 5).

**Tableau 5 :** Les quantités d'extraits secs et de la valeur de l'E pour les espèces étudiées

Nr. Echantillon	Espèce Étudiée	Quantité d'extrait sec [g]	Valeur de E [mg / ml]
1	<i>Anthyllis henoniana</i> Coss.	0.0397	4.42
2	<i>Centropodia forskalii</i> (Vahl) Cope	0.0471	5.24
3	<i>Ephedra alenda alata</i> (Stapf.) Trab	0.0510	5.66
4	<i>Euphorbia guyoniana</i> Boiss. and Reut.	0.0412	4.57
5	<i>Helianthemum confertum</i> Dunal	0.0239	2.65
6	<i>Henophyton deserti</i> Coss. & Durieu	0.0261	2.90
7	<i>Spartidium saharae</i> Pomel	0.0919	10.21

Les extraits secs ont été utilisés pour obtenir, pour chaque échantillon, des séries de 9 systèmes, dispersés dans l'eau de mer, en concentrations de E à E /5 où le dénominateur augmente par pas de 0,5. L'activité toxicologique a été testée sur les larves d'*Artemia nauplii*. Au total, 20 larves de cette espèce ont été placées à partir du premier jour, dans chaque bocal de la série d'observation.

## 2.4. Essais antioxydants

### 2. 4.1. Matériel & Méthode

Pour une quantité de 10 g de produit végétal séché et broyée, nous avons effectué une extraction par filtration dans 100 g de solvant constitué de 50% d'éthanol dans l'eau (v / v), et ce durant une période de 24 heures. Les extraits dans l'éthanol / eau ont été notés EW. Les

solutions d'extraits résultants, ont été concentrées par évaporation rotative à 50°C jusqu'à un volume de 15 ml, puis ont été soumis à une lyophilisation à -40°C. Les solutions mères de DMSO ont été préparées. Une quantité de 0.14 mL de solution tampon et 0.1 mL d'une solution de xanthine a été ajoutée aux puits à une concentration finale de 33 mM et 0,05 mM. Les extraits ont été ajoutés dans des volumes appropriés, de telle sorte que la concentration finale de DMSO dans l'essai ne dépasse pas 3,3% du volume total. La réaction a été initiée par l'addition automatique d'une solution de 0.05 mL de Xanthine Oxydase à une concentration finale de 0.006 unités / ml. Chaque extrait a été testé 3 fois. L'Allopurinol a été utilisé comme témoin positif. Les valeurs EC50 ont été calculées en analysant les valeurs de pourcentage d'inhibition à chaque concentration en utilisant le logiciel GraphPad Prism 5.04 (GraphPad Software Inc.) avec une régression non linéaire. La capacité des extraits de piégeage des radicaux libres a été testée en utilisant la méthode du DPPH. En résumé, le composé d'essai réagit avec un radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle stable (DPPH) et la réduction du DPPH est suivie en surveillant la diminution de l'absorbance à 550 nm, en utilisant la Fluostar Optima (BMG LABTECH) d'un lecteur de plaques de fluorescence dans un volume total de 200 µl. Un échantillon de solutions mères deux DPPH et de test ont été préparés en HPLC MeOH à 100 µM et 1 mg / ml, respectivement. Des échantillons ont été ajoutés aux puits en fonction de la concentration désirée, et dilués en série dans les puits suivants. La réaction fut entamée en ajoutant 100 µl de solution de DPPH à chaque puits. La diminution de l'absorbance a été déterminée après 30 et 60 minutes en deux fois. Au cours de la période de réaction, le mélange a été tenu à l'écart de la lumière. L'acide ascorbique a été utilisé comme témoin positif.

Les principaux résultats de l'ensemble de ces expérimentations, sont présentés dans la partie III du présent mémoire. Ainsi, chaque chapitre correspond soit à un article déjà publié dans une revue avec impact factor, soit en cours de publication, soit également en cours de rédaction.

**PARTIE III : RÉSULTATS OBTENUS DISCUSSIONS &  
CONCLUSION GENERALE**

## CHAPITRE I :

### **STUDY OF *IN VITRO* ANTIMICROBIAL AND ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITIES OF SELECTED SAHARAN PLANTS**

Ionut F. Palici,<sup>1</sup> Erika Ilkator-Busa,<sup>2</sup> István Zupkó,<sup>3</sup> Blaise Touzard,<sup>4</sup> Mohamed Chaieb,<sup>5</sup>  
Edit Urbán<sup>6</sup> and Judit Hohmann<sup>2</sup>

*Acta Biologica Hungarica* 66(4), pp. 385–394 (2015) DOI: 10.1556/018.66.2015.4.3

**(IF: 0.71)**

## STUDY OF *IN VITRO* ANTIMICROBIAL AND ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITIES OF SELECTED SAHARAN PLANTS

IONUT F. PALICI,<sup>1</sup> ERIKA LIKTOR-BUSA,<sup>2</sup> ISTVÁN ZUPKÓ,<sup>3</sup> BLAISE TOUZARD,<sup>4</sup>  
MOHAMED CHAIEB,<sup>5</sup> EDIT URBÁN<sup>6</sup> and JUDIT HOHMANN<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Botany, University of Medicine and Pharmacy,  
Timisoara 300041, Romania

<sup>2</sup>Department of Pharmacognosy, University of Szeged, H-6720 Szeged, Hungary

<sup>3</sup>Department of Pharmacodynamics and Biopharmacy, University of Szeged, H-6720 Szeged, Hungary

<sup>4</sup>Department of Community Ecology, UMR INRA BIOGECO, University of Bordeaux,  
Pessac 33615, France

<sup>5</sup>Department of Biology and Ecology of Arid Land, UR 11ES71, University of Sfax, Sfax 3038, Tunisia

<sup>6</sup>Institute of Clinical Microbiology, University of Szeged, H-6725 Szeged, Hungary

(Received: February 17, 2015; accepted: May 13, 2015)

The aim of the present study was the evaluation of the antimicrobial and antiproliferative activities of selected Saharan species, which are applied in the traditional medicine but not studied thoroughly from chemical and pharmacological point of view. The studied plants, namely *Anthyllis henoniana*, *Centropodia forskalii*, *Cornulaca monacantha*, *Ephedra alata* var. *alenda*, *Euphorbia guyoniana*, *Helianthemum confertum*, *Henophyton deserti*, *Moltkiopsis ciliata* and *Spartidium saharae* were collected from remote areas of North Africa, especially from the Tunisian region of Sahara. After drying and applying the appropriate extraction methods, the plant extracts were tested in antimicrobial screening assay, performed on 19 Gram-positive and negative strains of microbes. The inhibition zones produced by plant extracts were determined by disc-diffusion method. Remarkable antibacterial activities were exhibited by extracts of *Ephedra alata* var. *alenda* and *Helianthemum confertum* against *B. subtilis*, *M. catarrhalis* and methicillin-resistant and non-resistant *S. aureus*. Minimum inhibitory concentrations of these two species were also determined. Antiproliferative effects of the extracts were evaluated against 4 human adherent cell lines (HeLa, A431, A2780 and MCF7). Notable cell growth inhibition was found for extract of *Helianthemum confertum* and *Euphorbia guyoniana*. Our results provided data for selection of some plant species for further detailed pharmacological and phytochemical examinations.

**Keywords:** Saharan plants – *Ephedra alata* var. *alenda* – *Helianthemum confertum* – Antibacterial activity – Antiproliferative activity

### INTRODUCTION

Nowadays the use of natural products including medicinal plants has come to the front in the human therapy especially in developing countries. In these regions, inclusive the Saharan territory, a large part of the population still apply traditional medicine to treat even serious diseases. A huge number of chemical and pharmacological studies of plant species are performed to find new lead compounds for developing new therapeutic agents of human diseases such as cancer or infections. Despite the

\*Corresponding author; e-mail address: hohmann@pharm.u-szeged.hu

wide spectra of antimicrobial drugs, the infectious diseases including multidrug resistant pathogens and new infections, are still a worldwide problem, moreover the cancerous diseases are the one of leading causes of death globally. These facts encourage the search for new antimicrobial and anticancer agents with much more higher activity and better side effect spectrum.

Because of the conditions of drastic climate, very few number of plant species, mainly bushes, shrubs or sub-shrubs are found in Sahara. The morphological and physiological characteristics of these plants adapted to the arid environment and the limited availability of water [8]. Moreover, the ability of plants to synthesize primary and secondary metabolites can help the survival in these extreme environmental and the protection against pathogenic attacks. As a consequence of harsh conditions these compounds possibly possess very unique structures with some remarkable biological activities [15].

Despite some studies on the Saharan plants, performed especially in Tunisian arid area, our knowledge about Saharan species are still scant. Most of investigations, performed in recent years on the Saharan flora and vegetation, are purely descriptive, and only a few experimental studies have been performed [1, 18, 24]. Since the literature search showed the absence of information about biological and phytochemical properties of plants from Sahara, the aim of our study was to carry out a pharmacological investigation on selected Saharan plants, which are endemic and/or used in the local traditional medicine. We have limited information about traditional application of these selected species, since they are found mainly in underpopulated area of Saharan desert. *E. guyoniana* is used in local medicines for treatment of skin diseases and *C. monantha* is applied as laxative, hepatoprotective and antiparasitic medicine by the Moroccan traditional healers [4, 17]. *M. ciliata* is used in veterinary medicine for improving of lactation of camels and *C. forskalii* are known as food for ruminants [7, 26].

In this project 9 species were collected for examination of their antimicrobial and cytostatic activities. Excluding three species, namely *Ephedra alata* var. *alenda* (Stapf.) Trabut, *Henophyton deserti* (Coss.&Durieu) and *Euphorbia guyoniana* (Boiss. and Reut.), the other species included in our study were poorly investigated previously as regards their biological effects and chemical constituents responsible for the activities. The present paper reports the evaluation of antimicrobial and cancer cell growth inhibitory activities of Saharan plants in order to reveal their therapeutic profile.

## MATERIALS AND METHODS

### *Plant material*

The aerial parts of plants and the aerial and underground parts of *H. confertum* were collected in March 2013 from Tunisian rural areas. The plant materials were identified by Prof. M. Chaieb at University of Sfax. The voucher specimens (numbers in Table 1) have been deposited at the Department of Pharmacognosy, University of Szeged, Hungary.

### *Extraction of plant material*

The dried and powdered plant materials (20 g) were extracted with ethanol-water (50:50; 200 mL) mixture by percolation at room temperature for 24 h. The extracts were filtered and evaporated at 40 °C under reduced pressure to remove ethanol, and then lyophilized. The obtained dried powders were stored at –20 °C until used.

### *Test organisms*

The following microorganism were employed as test strains in the screening assay: 8 Gram-positive strains namely, *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Enterococcus faecium* (QC 2008), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Streptococcus agalactiae* (ATCC 13813), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 49619), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19613) and 10 Gram-negative strains namely, *Acinetobacter lwoffii* (ATCC 44677), *Citrobacter freundii* (ATCC 34015), *Enterobacter cloacae* (ATCC 45268), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Haemophilus influenzae* (10211), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Moraxella catarrhalis* (ATCC 25238), *Proteus mirabilis* (HNCMB 60076), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella enteritidis* (HNCMB 10092), *Shigella sonnei* (ATCC 25201). In addition one multiresistant strain, namely methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (ATCC 43300) was also used as test organism. The test organisms were cultured at Columbia agar+5% sheep blood (COS) plates (bioMérieux) at 37 °C. Chocolate agar+PolyVitek™ (PVX) (bioMérieux) was used for growing of *Haemophilus influenzae*. The culture of bacteria were maintained in their appropriate plates at 4 °C throughout the experiment and used as stock cultures.

### *Antibacterial screening assay*

The antibacterial activity of plant extracts was evaluated with disc-diffusion method [5]. The bacterial isolates for screening assay were prepared by picking single colony from 24-h old plates and it was suspended in sterile, isotonic saline solution (5 mL) to reach 0.5 McFarland standard of optical turbidity, resulting a suspension containing approximately  $1-2 \times 10^8$  CFU/mL. The bacterial suspension was spread on sterile appropriate plates by sterile cotton swab. Sterile filter paper discs (6 mm of diameter) were loaded with the extracts (20 µL of dried extracts redissolved in ethanol water (40/60 v/v) at 50 mg/mL) and after drying they were placed on the plates. Amoxicillin combination with clavulanic acid and vancomycin were employed as positive controls. Negative controls were performed with paper discs impregnated with 20 µL of solvent. The plates were then incubated at 37 °C for 24 hours under aerobic conditions. The diameters of inhibition zone produced by the plant extracts were measured and recorded (diameter of the inhibition zone plus diameter of the disc).

### *Determination of minimum inhibitory concentration*

The minimum inhibitory concentrations of plant extracts of *Ephedra alata* var. *alenda* and *Helianthemum confertum* were determined with microdilution method [19]. The single colony of cultured bacteria was suspended in Mueller-Hinton (MH) broth and the suspension was adjusted to 0.5 McFarland standard turbidity. In a sterile 96-well plate, 20  $\mu$ L of samples from the stock solutions (50 and 100 mg/mL of extracts of *Ephedra alata* var. *alenda* and *Helianthemum confertum*, respectively dissolved in DMSO) were diluted with MH. Twofold serial dilutions were prepared to produce the final concentration range of 5000 to 4.9  $\mu$ g/mL and 10,000 to 9.7  $\mu$ g/mL of extracts of *E. alata* var. *alenda* and *H. confertum*, respectively. The bacterial suspension (100  $\mu$ L) was then added to the wells. The final volume of each well was 200  $\mu$ L. Control wells were prepared with culture medium, bacterial suspension only and DMSO in amount corresponding to the highest concentration present. After mixing, the plates were incubated at 37 °C for 24 h in aerobic environment. The MIC value was determined by observing the turbidity of media. The MIC was the lowest concentration of extracts showing no detectable bacterial growth. The experiment was performed twice in triplicate.

### *Evaluation of antiproliferative activity*

Antiproliferative effects of the prepared plant extracts were measured *in vitro* on four human cell lines: HeLa (cervix adenocarcinoma), A431 (skin epidermoid carcinoma), A2780 (ovarian carcinoma) and MCF7 (breast adenocarcinoma) by using the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay [21]. Briefly, cancer cells were seeded onto a 96-well microplate (5000/well) and attached to the bottom of the wells overnight. On the second day, new medium containing the tested extract was added. After incubation for 72 h, the living cells were assayed by the addition of 20  $\mu$ L of 5 mg/mL MTT solution. 4 h later the medium was removed, and the precipitated crystals were dissolved in 100  $\mu$ L of dimethyl sulfoxide (DMSO) during a 60-min period of shaking. Finally, the absorbance was measured at 545 nm, using a microplate reader; wells with untreated cells were utilized as controls. All *in vitro* experiments were carried out on two microplates with at least five parallel wells. Cisplatin was used as reference compound. Stock solutions of the tested extracts (10 mg/mL) were prepared with DMSO. The cell lines were treated with extracts at concentrations of 10 or 30  $\mu$ g/mL. The higher concentration of DMSO (0.3%) did not exert substantial action on the viability of the utilized cell lines [20].

## RESULTS

A total of 10 aqueous-alcoholic extracts representing 9 plant species were subjected to bioassay. The botanical names with voucher specimen numbers and families are presented in Table 1.

The results obtained in the screening of antimicrobial activity of selected Saharan plants are shown in Table 2. Among 9 plant species included in this experiment, extracts of 6 species exhibited antibacterial effects. It was found that, the activity was shown mainly against Gram-positive strains. Among the tested Gram-negative bacteria only *Moraxella catharrhalis* was susceptible to the investigated plant extracts. In the current study, none of the extracts inhibited *C. freundii*, *E. faecium*, *S. epidermidis*, *S. agalactiae*, *S. pneumonia*, *S. pyogenes*, *A. lwoffii*, *E. cloacae*, *E. coli*,

Table 1  
List of plants screened in this study

Plant	Voucher specimen no.	Family	Part tested
<i>Anthyllis henoniana</i> (Coss.)	827	Fabaceae	aerial
<i>Centropodia forskalii</i> (Vahl.)	829	Poaceae	aerial
<i>Cornulaca monacantha</i> (Delile)	835	Amaranthaceae	aerial
<i>Ephedra alata</i> var. <i>alenda</i> (Stapf.) Trabut	831	Ephedraceae	aerial
<i>Euphorbia guyoniana</i> (Boiss.&Reut.)	832	Euphorbiaceae	aerial
<i>Helianthemum confertum</i> (Dunal)	828	Cistaceae	aerial and underground
<i>Henophyton deserti</i> (Coss.&Durieu)	830	Brassicaceae	aerial
<i>Moltkiopsis ciliata</i> (Forssk.)	833	Boraginaceae	aerial
<i>Spartidium saharae</i> (Coss.&Durieu)	834	Fabaceae	aerial

Table 2  
Antibacterial activity of the investigated plants in disc-diffusion method

Plant	Inhibition zone (mm)			
	Microbial strains			
	<i>B.s.</i>	<i>M.c.</i>	<i>S.a.</i>	MRSA
<i>A. henoniana</i>	9.5	6.5	9.5	–
<i>H. confertum</i> (aerial part)	16	15	11.5	–
<i>H. confertum</i> (rhizome, root)	11.5	8.5	11.5	–
<i>E. alata</i> v. <i>alenda</i>	9.5	7.5	9.5	14.5
<i>E. guyoniana</i>	–	10.5	7	–
<i>M. ciliata</i>	–	7	–	–
Amoxicilin + clavulanic acid	n.d.	32	n.d.	n.d.
Vancomycin	22	n.d.	16	16

Table 3  
MIC values of investigated plant extracts

Plant	MIC value (mg/mL)		
	Microbial strains		
	<i>B.s.</i>	<i>M.c.</i>	MRSA
<i>H. confertum</i> (aerial part)	0.26	0.13	–
<i>E. alata</i> v. <i>alenda</i>	–	–	>5

Data represent the mean value of MIC obtained from two independent experiments. Abbreviations: *B.s.*: *Bacillus subtilis*, *M.c.*: *Moraxella catarrhalis*, MRSA: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

*H. influenzae*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *S. enteritidis* and *S. sonnei*. However, antibacterial activities with low to remarkable potential were detected against *B. subtilis*, *M. catarrhalis* and *S. aureus*. Moreover the extracts of *E. alata* var. *alenda* demonstrated notable inhibition against methicillin-resistant *S. aureus*. The antibacterial activities of the extracts of *A. henoniana*, *H. confertum*, *E. alata* var. *alenda*, *E. guyoniana* and *M. ciliata* were observed against the aforementioned bacterial strains. The most pronounced activity with inhibition zone greater than 15 mm was found in case of the extract of *H. confertum*, which was active against *B. subtilis*, *M. catarrhalis* and *S. aureus* as well.

The MIC values are demonstrated in Table 3. The minimum inhibitory concentrations were determined against *B. subtilis*, *M. catarrhalis* and methicillin-resistant *S. aureus* for extracts of *H. confertum* and *E. alata* var. *alenda*. MIC values indicate that the extract of aerial part of *H. confertum* possesses remarkable antibacterial potential.

All plant extracts were tested for antiproliferative properties against four human cancer cell lines (HeLa, A431, A2780 and MCF7) at two final concentrations (10 and 30 µg/mL). None of the tested extracts elicited higher than 10% inhibition of cancer cell growth at the lower concentration. At 30 µg/mL extract from *Euphorbia guyoniana* exerted a minor antiproliferative action against MCF7 cells. Extract from aerial parts of *Helianthemum confertum* also caused a moderate inhibition of ovarian cancer cell growth, while the extract obtained from the root of the plant exerted much more substantial action selectively against the same cell line (Table 4).

Table 4  
Antiproliferative properties of the effective plant extracts

Plant	Conc. (µg/mL)	Growth inhibition (%) ± SEM	
		MCF7	A2780
<i>E. guyoniana</i>	30	18.26±0.81	–*
<i>H. confertum</i> (aerial part)	30	–	12.21±2.65
<i>H. confertum</i> (underground)	30	–	91.62±2.52

\*Extracts eliciting less than 10% inhibition of proliferation were considered ineffective (data are not given).

## DISCUSSION

In summary, our screening results confirmed that six plant species exhibited remarkable antibacterial activity against four bacterial strains, and notable cancer cell growth inhibition was observed for two extracts.

*Helianthemum confertum* produced the most effective activity against *B. subtilis*, *M. catarrhalis* and *S. aureus*. Besides the notable antimicrobial activity of *H. confertum*, the extract of its underground part displayed a considerable cytotoxic effect against ovarian cancer cell line A2780. It is important to notice that no published data on pharmacological or phytochemical investigation of *H. confertum* was found. So, this is the first report on antibacterial and antitumor effects of this species. However, previous work indicated that some *Helianthemum* species possess antimicrobial effects. The 80% methanolic extracts of *H. alypoides*, *H. manifoldum*, *H. cinereum* and *H. hirtum* showed good inhibitory activities against *S. aureus*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *E. coli* and *S. enterica* [28]. Another research group proved a strong antibacterial effect of *H. kahiricum* as well [6]. Any publication about the cytotoxic effects of *Helianthemum* species did not found in the literature, so this is also first time noted. However, the antiproliferative effects of *Cistus* species, which are taxonomically related to *Helianthemum* species, were recently demonstrated [25].

The extract of *Ephedra alata* var. *alenda* exhibited moderate antibacterial activity against three bacterial strains and strong inhibitory effect against methicillin-resistant *S. aureus*. In the case of this species, screening results of its antimicrobial capacity were partly in agreement with the findings reported earlier. Ghanem et al. proved the antibacterial effect of acetonitrile extract of *E. alata* against *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* and *E. coli* [11]. In our study, the extract of *Ephedra* species was inactive against *P. aeruginosa* and *E. coli*. The probable explanation of this difference is that, a subspecies of *Ephedra alata* was included in our investigation, and the different solvent, used for extraction process can also be the reason of the different activities. The presence of alkaloids, including ephedrine and pseudoephedrine, lignans, flavonoids and other phenolic compounds were referred in the extracts of *E. alata*, but the compounds responsible for the antibacterial activity is not identified yet [22, 23]. The antimicrobial effects of other *Ephedra* species were also described earlier. The water and ethanol extracts of *Ephedra intermedia* inhibited the growth of *S. aureus* with MIC of 0.5 mg/mL [16]. Transthorine, considered as a pharmacologically active compound of *E. transitoria*, was also identified. This quinoline alkaloid exhibited growth inhibitory activity against the common bacteria, *E. cloacae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus* [3].

*Euphorbia* genus is well investigated taxon of the plant kingdom. A less known species, *E. guyoniana* from this genus was tested in our experiment. Moderate antibacterial and noteworthy cytotoxic activity of its extract were observed. Some publications about chemical compositions of *E. guyoniana* were found in the literature. The characteristic compounds of *Euphorbia* genus, the diterpenoids were isolated from *E. guyoniana* as well. *Ent*-abietane and jatrophone polyester diterpenes were identified in the root and aerial parts of *E. guyoniana* [2, 13, 14]. The pharmacologi-

cal activity of this species was also reported. Antibacterial capacity and cytotoxic activity against HEK293 cell line of *E. guyoniana* were demonstrated, these results are in agreement with our findings [4, 10].

The existing knowledge about *Anthyllis* species is very limited. Antioxidant activity and phenolic compounds production of two related species, *A. aurea* and *A. vulneraria* were noted in the literature [12, 29]. Any publication on *A. henoniana*, tested in our screening was not found, so this is the first report about moderate antibacterial activity of this species.

Besides the pyrrolizidine alkaloid content of *Moltkiopsis ciliata*, any other chemical and biological information about this species is not available in the literature [26, 27]. In our screening, aqueous ethanolic extract of *M. ciliata* demonstrated a mild antibacterial activity against one Gram-negative strain, namely *M. catarrhalis*.

Any antibacterial and cytotoxic activities were not observed in case of the extracts of other species (*Centropodia forskalii*, *Cornulaca monacantha*, *Henophyton deserti* and *Spartidium saharae*). The references about the biological activity of these plants were not found in the literature, except *H. deserti*. The seed extracts of *H. deserti* showed good inhibitory capacity against *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. enterica* and *B. subtilis* [9]. The seed extract probably contains special antimicrobial compounds missing in the aerial part, which was inactive in our screening assay.

As concerns the antiproliferative activity, promising cell growth inhibitory results was exerted by the extract of underground part of *Helianthemum confertum*, which indicate that this plant is worthy for detailed phytochemical, pharmacological studies in order to identify compounds responsible for the antiproliferative effect.

In conclusion, the antimicrobial and anticancer activities of some Saharan plant species have been clearly demonstrated against Gram-positive, Gram-negative bacteria and human cancer cell lines. Our screening study proved that Saharan plant species are promising sources of potential antibacterial and antitumor agents. Our findings serve as starting points for selection of plant species for further investigation. The detailed examination of the pharmacologically active plant species, e.g. *H. confertum* and *E. alata* var. *alenda* aimed at isolation and structure elucidation of its bioactive compounds are in progress.

#### ACKNOWLEDGEMENT

This work is supported by Hungarian Scientific Research Fund (OTKA K109846). I. F. Palici is grateful for technical assistance of Prof. Zoltan Szabadai.

#### REFERENCES

1. Abdallah, L., Chaieb, M. (2007) Water status and growth phenology of a Saharan shrub in North Africa. *Afr. J. Ecol.* 45, 80–85.
2. Ahmed, A. A., Gherraf, N., El-Bassuony, A. A., Rhouati, S., Gad, M. H., Ohta, S., Hirata, T. (2006) Guyonianin A and B, 2 polyester diterpenes from Algerian *Euphorbia guyoniana*. *Nat. Prod. Commun.* 1, 273–279.

3. Al-Khalil, S., Alkofahi, A., El-Eisawi, D., Al-Shibib, A. (1998) Transthorine, a new quinoline alkaloid from *Ephedra transitoria*. *J. Nat. Prod.* 61, 262–263.
4. Amar, Z., Labib, S. N., Noureddine, G., Salah, R. (2012) Phytochemical screening of five Algerian plants and the assessment of the antibacterial activity of two extracts *Euphorbia guyoniana*. *Der. Pharmacia. Lettre.* 4, 1438–1444.
5. Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sheriss, J. C., Turck, M. (1966) Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45, 493–496.
6. Bouzergoune, F., Bitam, F., Aberkane, M. C., Mosset, P., Fetha, M. N. H., Boudjar, H., Aberkane, A. (2013) Preliminary phytochemical and antimicrobial activity investigations on the aerial parts of *Helianthemum kahiricum*. *Chem. Nat. Compd.* 49, 751–752.
7. Cunningham, P. L. (2013) Plants included in the diet of Arabian Sand Gazelle (Reem) from Saudi Arabia. *J. King Saud Univ. – Science* 25, 167–173.
8. Derbel, S. (2012) Statut écologique et stratégies adaptatives et fonctionnelles de certaines espèces végétales sahariennes Nord-africaines. Thèse de Doctorat, Université de Sfax, Sfax.
9. Derbel, S., Bouaziz, M., Dhoub, A., Sayadi, S., Chaieb, M. (2010) Chemical composition and biological potential of seed oil and leaf extracts of *Henophyton deserti* Coss. & Durieu. *C. R. Chim.* 13, 473–480.
10. El-Bassuony, A. A. (2007) Antibacterial activity of new polyester diterpenes from *Euphorbia guyoniana*. *Asian. J. Chem.* 19, 4553–4562.
11. Ghanem, P. D., Usama, I. A., El-Magly, P. D. (2008) Antimicrobial activity and tentative identification of active compounds from the medicinal *Ephedra alata* Male plant. *J. Taibah. Univ. Med. Sci.* 3, 7–15.
12. Godevac, D., Zdunic, G., Savikin, K., Vajs, V., Menkovic, N. (2008) Antioxidant activity of nine Fabaceae species growing in Serbia and Montenegro. *Fitoterapia.* 79, 185–187.
13. Haba, H., Lavaud, C., Marcourt, L., Long, C., Harkat, H., Benkhaled, M. (2009) Ent-abietane diterpenoids from *Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut. *Biochem. Syst. Ecol.* 37, 504–508.
14. Hegazy, M. E. F., Mohamed, A. H., Aoki, N., Ikeuchi, T., Ohta, E., Ohta, S. (2010) Bioactive jatrophan diterpenes from *Euphorbia guyoniana*. *Phytochemistry.* 71, 249–253.
15. Ibrahim, M. (2012) *Instinctive Plant Tolerance towards Abiotic Stresses in Arid Regions*. In: Najafpour, M. (ed.) Artificial Photosynthesis. InTech, Rijeka, pp. 219–233.
16. Jeppesen, A. S., Soelberg, J., Jager, A. K. (2012) Antibacterial and COX-1 inhibitory effect of medicinal plants from the Pamir Mountains, *Afghanistan*. *Plants.* 1, 74–81.
17. Kandil, F. E., Grace, M. H. (2001) Polyphenols from *Cornulaca monacantha*. *Phytochemistry* 58, 611–613.
18. Le Houérou, H. N. (1996) Climate change drought & desertification. *J. Arid. Environ.* 34, 133–185.
19. Mann, C. M., Markham, J. L. (1998) A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *J. Appl. Microbiol.* 84, 538–544.
20. Molnár, J., Ocsovszki, I., Puskás, L., Ghane, T., Hohmann, J., Zupkó, I. (2013) Investigation of the antiproliferative action of the quinoline alkaloids kokusaginine and skimmianine on human cell lines. *Curr. Signal. Transd. T.* 8, 148–155.
21. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
22. Nawwar, M. A., Barakat, H. H., Buddrus, J., Linscheid, M. (1985) Alkaloidal, lignan and phenolic constituents of *Ephedra alata*. *Phytochemistry* 24, 878–879.
23. Nawwar, M. A., El-Sissi, H., Barakat, H. H. (1984) Flavonoid constituents of *Ephedra alata*. *Phytochemistry.* 23, 2937–2939.
24. Ourcival, J. M., Floret, C., Le Floc’h, E., Pontanier, R. (1994) Water relations between two perennial species in the steppes of southern Tunisia. *J. Arid. Environ.* 28, 333–350.
25. Papaefthimiou, D., Papanikolaou, A., Givanoudi, S., Kanellis, A. K., Falara, V., Kostas, S. (2014) Genus *Cistus*: a model for exploring labdane-type diterpenes’ biosynthesis and a natural source of high value products with biological, aromatic, and pharmacological properties. *Front. Chem.* 2, 35.

26. Rizk, A. M., Hammouda, F. M., Ismail, S. I., Hassan, N. M., Hosseiny, H. A., Roeder, E., Wiedenfeld, H., Ghaleb, H. A., Madkour, M. K. (1988) Constituents of plants growing in Qatar. Part XV. Chemical investigation and pharmacotoxicity of pyrrolizidine alkaloids of *Moltikiopsis ciliata*. *Int. J. Crude. Drug. Res.* 26, 112–116.
27. Rizk, A. M., Heiba, H. I., Ma'Ayergi, H. A., Batanouny, K. H. (1986) Constituents of plants growing in Qatar. *Fitoterapia* 57, 3–9.
28. Rubio-Moraga, A., Argandona, J., Mota, B., Perez, J., Verde, A., Fajardo, J., Gomez-Navarro, J., Castillo-Lopez, R., Ahrazem, O., Gomez-Gomez, L. (2013) Screening for polyphenols, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from eleven *Helianthemum* taxa (Cistaceae) used in folk medicine in south-eastern Spain. *J. Ethnopharmacol.* 148, 287–296.
29. Tusevski, O., Kostovska, A., Iloska, A., Trajkovska, L., Simic, S. G. (2014) Phenolic production and antioxidant properties of some Macedonian medicinal plants. *Cent. Eur. J. Biol.* 9, 888–990.

# Planta Medica

Journal Abbreviation: PLANTA MED

Journal ISSN: 0032-0943 (Print), 1439-0221 (Electronic)

## About Planta Medica

Planta Medica is one of the leading international journals in the field of medicinal plants and natural products with original research papers, letters, rapid communications, reviews, minireviews and perspectives from researchers worldwide. Planta Medica publishes 17 issues per year. - The following areas of medicinal plants and natural products research are covered:

- Pharmacology and clinical studies
- Natural product chemistry
- Analytical studies
- Biochemistry, molecular biology, and biotechnology
- Biological screening

Year	IF
2015/2016	1.990
2014	2.152
2013	2.339
2012	2.348
2011	2.153
2010	2.369
2009	2.037
2008	1.960

URL <http://prodinra.inra.fr/record/343630>

Titre. sous titre Antimicrobial and antiproliferative activities of some North African desert plants

Ionut F. Palici  
University of Medicine and Pharmacy - Department of Pharmaceutical Botany, Roumanie.  
INRA, Institut National de la Recherche Agronomique - Université des Sciences et Technologies (Bordeaux 1) - UMR BIOGECO (Laboratoire Ecologie des Communautés), Talence, France.

Erika Liktör-Busa  
University of Szeged - Department of Pharmacognosy, Hongrie.

István Zupkó  
University of Szeged - Department of Pharmacodynamics and Biopharmacy, Hongrie.

Auteur(s) Blaise Touzard  
INRA - U. Bordeaux , UMR 1202 BIOGECO Biodiversité, Gènes et Communautés. Centre de recherche de Bordeaux Aquitaine, Cestas, France.

Mohamed Chaieb  
Université de Sfax - UR of Biology and Ecology of Arid Land, UR 11ES71, Tunisie.

Edit Urbán  
University of Szeged - Institute of Clinical Microbiology, Hongrie.

Judit Hohmann  
University of Szeged - Department of Pharmacognosy, Hongrie.

Type de produit Communication avec actes

Année 2015

Langue Anglais

Public visé Scientifique

Résumé  
The landscape of southern Tunisia areas is dominated by shrubs and woody plant species. Their morphological and physiological features being suitable for arid and Saharan bioclimate. It can be estimated that their phytochemical characteristics and metabolic activities are in accordance with the environment, and the plants have special spectrum of secondary metabolites, and offer a great medical and pharmaceutical potential. The present study aims the investigation of the biological activities on some plant species from the Tunisian region of Sahara. The studied species were: *Anthyllis henoniana* (Coss.), *Centropodia forskalii* (Vahl), *Comulaca monacantha* (Delile), *Ephedra alata* var. *alenda* (Stapf.) Trabut, *Euphorbia guyoniana* (Boiss. & Reut.), *Helianthemum confertum* (Dunal), *Henophyton deserti* (Coss. & Durieu), *Moltkiopsis ciliata* (Forssk.) and *Spartidium saharae* (Coss. & Durieu). The antibacterial activity was evaluated on 19 strains of microbes by disc-diffusion method with determination of the values of inhibition zones (7 – 14,5 mm) and minimum inhibitory concentrations (MIC = 0,1 – 5 mg/mL). A moxycilin+clavulanic acid and vancomycin were applied as positive controls in the experiments. In vitro antiproliferative effect of the extracts was evaluated against 4 human adherent cell lines (HeLa, A431, A2780 and MCF7) using the MTT assay and cisplatin as reference compound. The aqueous-ethanolic (1:1) extracts of six desert plants showed antimicrobial activity against *Bacillus subtilis*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus* or methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Extracts of *E. guyoniana* and *H. confertum* showed antiproliferative activity on breast adenocarcinoma (MCF7), and ovarian carcinoma (A2780) cell lines. Our screening study proved that Saharan plant species are promising sources of potential antibacterial and antitumor agents. Our findings serve as starting points for selection of plant species for further investigation.

Anglais

Série/Collection [Planta Medica](#)  
[.81 \(Issue: 16\)](#)

Titre abrégé Planta med.

ISSN 0032-0943

Pages 1503

Comité de lecture Avec comité de lecture

Diffusion de la Publique

notice

Mots-clés INRA Localisation géographique : [tunisie](#) ; [sahara](#)  
Composé chimique, Facteur du milieu : [climat aride](#)  
Objet d'étude : [espèce végétale](#)  
Phénomène, processus et fonction : [activité antibactérienne](#) ; [inhibition](#)

DOI [10.1055/s-0035-1565661](https://doi.org/10.1055/s-0035-1565661)  
WOS [000367558100386](https://www.wos.com/000367558100386)

Evènement [63. International Congress and Annual Meeting of the Society-for-Medicinal-Plant-and-Natural-Product-Research \(GA\) ; Budapest \(Hongrie\) - \(2015-08-23 - 2015-08-27\) / Congrès](#)

Type d'acte Book of abstracts

Conférence invitée Non

Type de communication Abstract

N° de la communication PW-37

Comment citer ce document : Palici, I. F., Liktor-Busa, E., Zupkó, I., Touzard, B., Chaieb, M., Urbán, E., Hohmann, J. (2015). . Antimicrobial and antiproliferative activities of some North African desert plants. *Planta Medica*, 81 (Issue: 16). Presented at 63. International Congress and Annual Meeting of the Society-for-Medicinal-Plant-and-Natural-Product-Research (GA), Budapest, HUN (2015-08-23 - 2015-08-27). DOI : 10.1055/s-0035-1565661  
<http://prodinra.inra.fr/record/343630>

## CHAPITRE II:

### **Preliminary toxicity of some extracts from Saharan plants species**

Palici, Ionut Florin<sup>1 &4</sup> ; Masotti, Véronique.<sup>2</sup> ; Chaieb, Mohamed.<sup>3</sup> \* & Touzard , Blaise.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>University of Medicine & Pharmacy Victor Babès, 300041 Timisoara, Romania.

<sup>2</sup>IMBE – Aix-Marseille University, Campus de St Charles, 13000 Marseille, France.

<sup>3</sup>BIOECOS-MA, University of Sfax, Faculty of Sciences, 3000 Sfax, Tunisia.

<sup>4</sup>BIOGECO- University of Bordeaux, 33000 Talence, Brodeaux France.

[palici.ionut@umft.ro](mailto:palici.ionut@umft.ro) ; [veronique.masotti@imbe.fr](mailto:veronique.masotti@imbe.fr) ; [Mohamed.Chaieb@gnet.tn](mailto:Mohamed.Chaieb@gnet.tn) ;

[blaise.touzard@u-bordeaux.fr](mailto:blaise.touzard@u-bordeaux.fr)

\* : *Corresponding author*

*Accepted with minor corrections, by Pakistan Journal of Botany (IF: 1.2)*

# Preliminary toxicity of some extracts from Saharan plants species

Palici, Ionut Florin<sup>1 & 4</sup> ; Masotti, Véronique. <sup>2</sup> ; Chaieb, Mohamed.<sup>3</sup> \* & Touzard , Blaise. <sup>4</sup>

<sup>1</sup>University of Medicine & Pharmacy Victor Babès, 300041 Timisoara, Romania.

<sup>2</sup>IMBE – Aix-Marseille University, Campus de St Charles, 13000 Marseille, France.

<sup>3</sup>BIOECOS-MA, University of Sfax, Faculty of Sciences, 3000 Sfax, Tunisia.

<sup>4</sup>BIOGECO- University of Bordeaux, 33000 Talence, Brodeaux France.

[palici.ionut@umft.ro](mailto:palici.ionut@umft.ro) ; [veronique.masotti@imbe.fr](mailto:veronique.masotti@imbe.fr) ; [Mohamed.Chaieb@gnet.tn](mailto:Mohamed.Chaieb@gnet.tn) ;

[blaise.touzard@u-bordeaux.fr](mailto:blaise.touzard@u-bordeaux.fr)

\*: Corresponding author

## Abstract

This study concerns the cytotoxic activity of some saharan plants species from North Africa (Tunisia) on the larvae of *Artemia*. Aerial parts of plants were collected in April 2013, from the Tunisian Saharan region at the edge of the Grand Erg Oriental. This region is characterized by a Saharan mediterranean bioclimate, where the average annual rainfall is less than 100 mm. In these deserts, the plants are very rich in some important secondary metabolites that may have a certain pharmacological activities. For each studied species, 10grams of vegetal powder has been basified using 0.5 ml of concentrated  $\text{NH}_4\text{OH}$ , then put in contact with 100 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The mixture has been extracted in column for 24 hours, and then concentrated in rotary evaporator to 15 mL extractive solution. Brine shrimp is a marine organism used often in toxicological assays. In this experiment, their viability has been tested using scales of concentrations. Shrimps were counted every hour on a ten-hour period. In case that viability of shrimp in extractive solutions remained at a high level, observations were continued for another 7 days.

The main results based on the cytotoxic activity of studied plants, classify these species into two categories. The first category concern the plants with strong cytotoxic activity: *Ephedra alata alenda*, *Euphorbia guyoniana* and *Helianthemum confertum* (underground part), where a notable cytotoxic activity can be observed within a period of 10 hours. The second category

concerns the plants with weak cytotoxic activity: *Anthyllis henoniana*, *Centropodia forsskaolii*, *Henophyton deserti* and *Spartidium saharae*, where a notable cytotoxic activity can be observed within a period of 7 days.

**Keys words:** Saharan plants; *Artemia*; vegetal extract; secondary metabolites; toxic activity.

## I. Introduction

Despite the extreme conditions, Sahara shows a remarkable flora, composed mainly of grasses, bushes and shrubs, whose physiological mechanisms enable them to live in desert harsh environment.

Most of Saharan plants constitute food for herbivores. Harsh climatic conditions in the North African desert determine the existence of specific and important secondary metabolites [1] that may exhibit a certain biological activity. However, the biological activity of several of the species included in this research has not been comprehensively studied. Most of the research to date has approached taxonomic and ecological aspects.

Studies in the field of biological activity of Saharan plants represent a great challenge due to extreme dry climate conditions. This climate eventually triggered the production of specific metabolites, and thus enabling these plants to withstand such harsh conditions. In addition, even identifying the habitats and plant harvesting are often difficult tasks. Naturally, the most relevant study of these species were carried out under the tutelage of research institutes situated near Saharan wilderness, often in collaboration with European researchers. The most remarkable studies focused on the unique ecological aspects on the biological activity of some Saharan plants. Thereby, Derbel [2] carried on exhaustive studies on *Ephedra alata alenda* (species also included in our study) seed germination under various conditions of temperature and fungicide treatment, as a part of their efforts

in desert revegetation. Another species included in our study, namely *Henophyton deserti*, has already been studied in terms of phytochemical composition and biological activity [3].

Encouraging preliminary results in the field of cancer therapy have been obtained from the research on some species of *Euphorbia* [4]. Thus, we also estimated that the study of *Euphorbia guyoniana* species with respect of the cancer field is worth considering.

Larvicidal activity of some Saharan plants extracts was tested on *Artemia nauplii* larvae. The species of the genus *Artemia* are suitable for this type of testing and in fact are frequently used for this kind of research [5].

## **II. Material and Methods**

### **1. Site of collection of plants**

Aerial parts of studied species were collected in April 2013, from the Saharan region of the Tunisian South (Tab. 1). This region is located at the edge of the Grand Erg Oriental, and is characterized by a Saharan Mediterranean bio-climate, where the average annual rainfall is less than 100 mm. The temperature is high especially during the summer season. We note a water deficit and drought spread over very long periods of the year (nine months per year). These weather conditions are likely to influence the chemical composition of plant species, especially regarding the nature and levels of their secondary metabolites.

**Table 1: summary of biologicals and ecologicals characteristics of the studied species.**

Species	Botanical Family	Life form (Raunkiaer 1937)	Sites of collecte	Type of bioclimat	Type of soil	GPS Coordinate
<i>Anthyllis henoniana</i>	<i>Fabaceae</i>	Chamaephyte	Bir Soltane	saharan bioclimate	sandy limestone	33.3668 N 8.6346 E
<i>Centropodia forsskaolii</i>	<i>Poaceae</i>	Hemi-cryptophyte	Hazwa		deep sandy	33.9208 N 8.0986 E
<i>Ephedra alata alenda</i>	<i>Ephedraceae</i>	Nano-Phanerophyte	El Fawar		deep sandy	33.3734 N 8 . 7234 E
<i>Euphorbia guyoniana</i>	<i>Euphorbiaceae</i>	Hemi-cryptophyte	Bir soltane		deep sandy	33.3735 N 8.7237 E
<i>Helianthemum confertum</i>	<i>Cistaceae</i>	Chamaephyte	Hazwa		Gypso-sandy soil	33.7437 N 7.59.43 E
<i>Henophyton deserti</i>	<i>Brassicaceae</i>	Chamaephyte	Bir Soltane		sandy limestone	33.3668 N 8.6346 E
<i>Spartidium saharae</i>	<i>Fabaceae</i>	Nano-Phanerophyte	Hazwa		deep sandy	33.7437 N 7.59.43 E

## 2. Plant Material

**2.1. *Anthyllis henoniana* Coss., *Fabaceae*** is a desert shrub known for its resistance in conditions of water stress [6]. *Anthyllis henoniana* has pinnaticomposed leaves, hairy receptades, zygomorphic white flowers with pink veins, monosperm legume.

**2.2. *Centropodia forsskaolii* (Vahl) Cope *Poaceae*** is another grass common on Saharan sands, where constitutes food for gazelles and dromedaries. Its roots present rhizosheats, stems are decumbent, articulated, with terminal panicles.

**2.3. *Ephedra alata alenda* (Stapf.) Trab. *Ephedraceae*** is a dioecious Saharan shrub, common in Middle and Southern part of Tunisia. Like many other Saharan species, its roots are long, creeping trough the sandy soil. Branchy stem reduced leaves, yellow male pollen cones and

seeded female cones. Relevant studies have addressed its systematics, chemical composition, biological activity [7] and seed germination. Species of *Ephedra* are known for their content in ephedrine, which confers most of plant's medicinal uses. However, besides its sympathomimetic action, some antimicrobial and antifungal effects of several species of *Ephedra* have been described [8].

**2.4. *Euphorbia guyoniana* Boiss. and Reut. Euphorbiaceae** is a Saharan herbaceous plant containing a white, milky latex, elongated leaves, yellow flowers in cymose inflorescences, fruits capsules. It is known in traditional medicine as cure against scorpion stings [9] and viper bites [10]. Some diterpenoids and triterpenoids were identified [11]. Many species of genus *Euphorbia* have been extensively studied. Such examples include, *Euphorbia falcata*, whose diterpenes show a synergism with some antitumor drugs [12] and *Euphorbia salicifolia*, showing content in salicifoline, a tricyclic diterpene and salicinolide, a bishomoditerpene lactone [13].

**2.5. *Helianthemum confertum* Dunal. Cistaceae** is a trailing shrub with thick lanceolate leaves, pentamere yellow flowers, oval capsules. This species has a restrained, virtually unknown habitat. Poor botanical and ecological information and essentially no data on its biological activity have been reported to date.

**2.6. *Henophyton deserti* (Coss. & Durieu) Coss. & Durieu**, also known as *Oudneya deserti* or *Oudneya africana* (Coss. & Durieu) Bullock, *Brassicaceae*, is an evergreen shrub, strictly Saharan. Its leaves are alternes, lanceolates, thick and fleshy, tetramere mauve flowers, and dry dehiscent siliques. According to Derbel et al., extracts show an antimicrobial activity [3].

**2.7. *Spartidium saharae* (Coss. & Durieu) Pomel, Fabaceae**, is the only species of genus *Spartidium*. It is a branchy shrub common on sandy habitats. Elongated leaves of about 1 cm length, zygomorphe yellow flowers, flattened seeded legumes. Some alkaloids and flavonoids have been detected [14].

For all studied species, botanical identification was made by Prof. Mohamed Chaieb (co-author of this study), and a sample of each species was deposited at the Laboratory of Botany at the University of Sfax (Tunisia).

### 1. Extraction method

Our plants have been harvested in the Tunisian desert (North Africa). They have been dried at ambient temperature for 3 days and milled to powder. For each studied species, a total of 10 grams of vegetal powder has been basified using 0.5 ml of concentrated  $\text{NH}_4\text{OH}$ , and then combined with 100 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The mixture has been extracted in a glass column of 500 ml, covered with aluminium foil, for 24 hours, and then concentrated in rotary evaporator to a total of 15 ml extract.

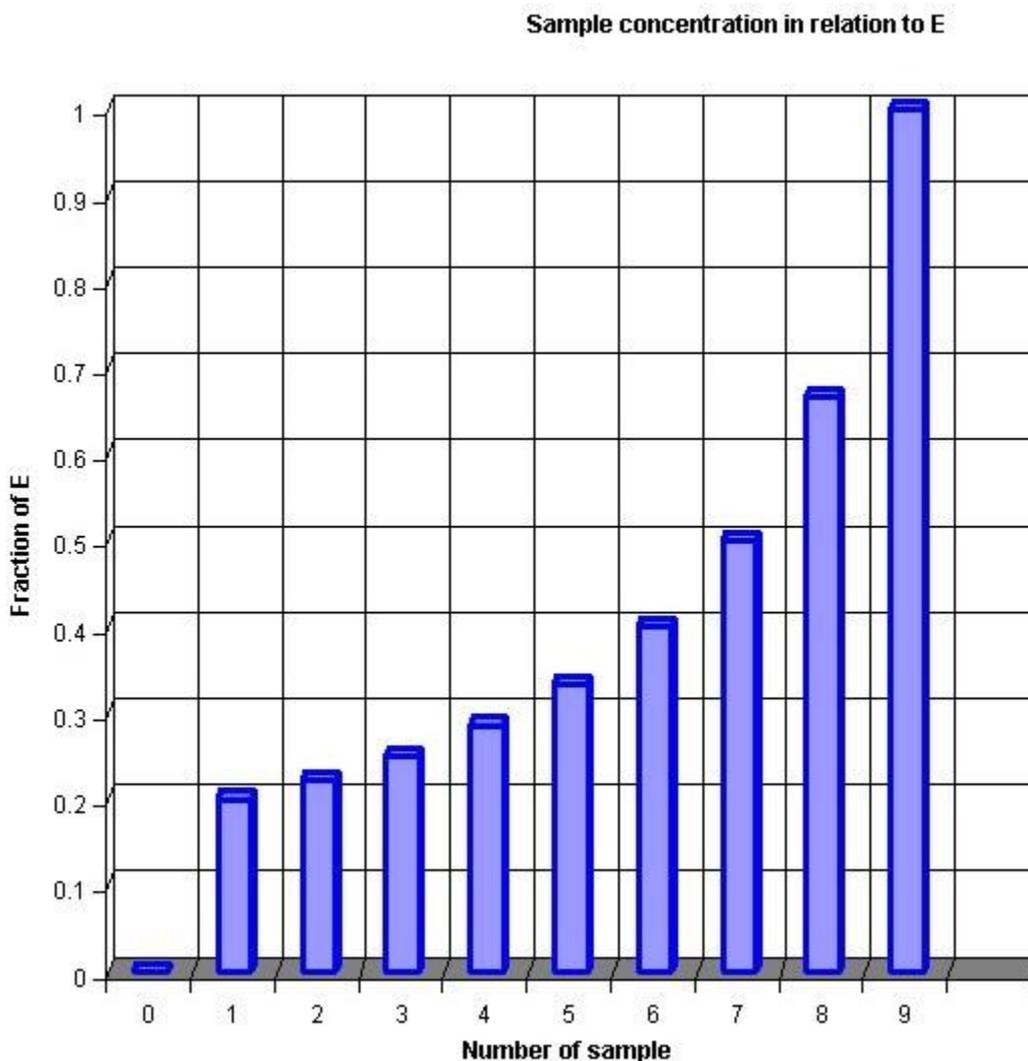
In a 50 ml separating funnel, the concentrated extract was then treated with 15 ml solution of  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2%, mixed and separated. This operation was repeated 3 times and then all acid phases were pooled in a solution (45 ml). After basification with  $\text{NH}_4\text{OH}$ , a new stepwise extraction was performed, by using 3 times a volume of 45 ml of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The 3 resulted extracts were then combined, resulting 135 ml, and subjected to concentration in rotary evaporator to 2 ml, then evaporated to dry in a hemolysis tube.

After a series of explorations conducted on extracts of the underground part of *Helianthemum confertum*, we determined that the concentration range at which the relevant biological activity is observed lies within 0.53 mg/ml and 2.65 mg/ml. Maximum concentration of 2.65 mg/ml corresponds to the ninth part of 0.0239g total dry extract of *Helianthemum confertum*, resulted from 10 g plant powder, dispersed in 1 ml sea water. This fraction of 1/9 from dry extract dispersed in 1 ml sea water has been taken as the benchmark for all species involved in this study and was labeled "E" (etalon).

Brine shrimp is a marine organism used often in toxicological assays.

In our experiment, their viability has been tested using series of concentrations obtained by successive dilution of sample E, of values from E to E/5.

The values of percent concentration can be expressed by formula  $f(n) = E/(5-0.5n)$  where  $x$  is an integer from 0 to 8. Consequently, we will have 9 samples with concentrations from  $E/5$  to  $E$ , in steps of  $1 / (5 - 0.5n)$ , labeled from 1 to 9. The assigned number for standard sample, represented by marine water, is 0 (zero). In the figure 1, the sample concentration in relation to  $E$  is presented.



**Figure 1. Sample concentration in relation to E.**

The idea of a non-linear concentration variability may have practical applications, and may even be preferable when it comes to decreasing the dose by diluting solution. The disadvantage would be that by adding varying amounts of diluent, it results different amounts of solutions. In laboratory conditions, this disadvantage can be avoided by using varying amounts of standard "E", previously calculated, dilutable to the desired volume. Mathematically, both linear and

non-linear concentration variability, are correct. In the table 2, we give the numerical values of E for each studied species.

**Table 2. Quantities of dry extracts and value of E for studied species.**

Nr. Crt.	Species	Quantity of dry extract [grams]	Value of E [mg/ml]
1	<i>Anthyllis henoniana</i> Coss.	0.0397	4.42
2	<i>Centropodia forsskaolii</i> (Vahl) Cope	0.0471	5.24
3	<i>Ephedra alenda alata</i> (Stapf.) Trab.	0.0510	5.66
4	<i>Euphorbia guyoniana</i> Boiss. And Reut.	0.0412	4.57
5	<i>Helianthemum confertum</i> Dunal	0.0239	2.65
6	<i>Henophyton deserti</i> Coss. & Durieu	0.0261	2.90
7	<i>Spartidium saharae</i> Pomel	0.0919	10.21

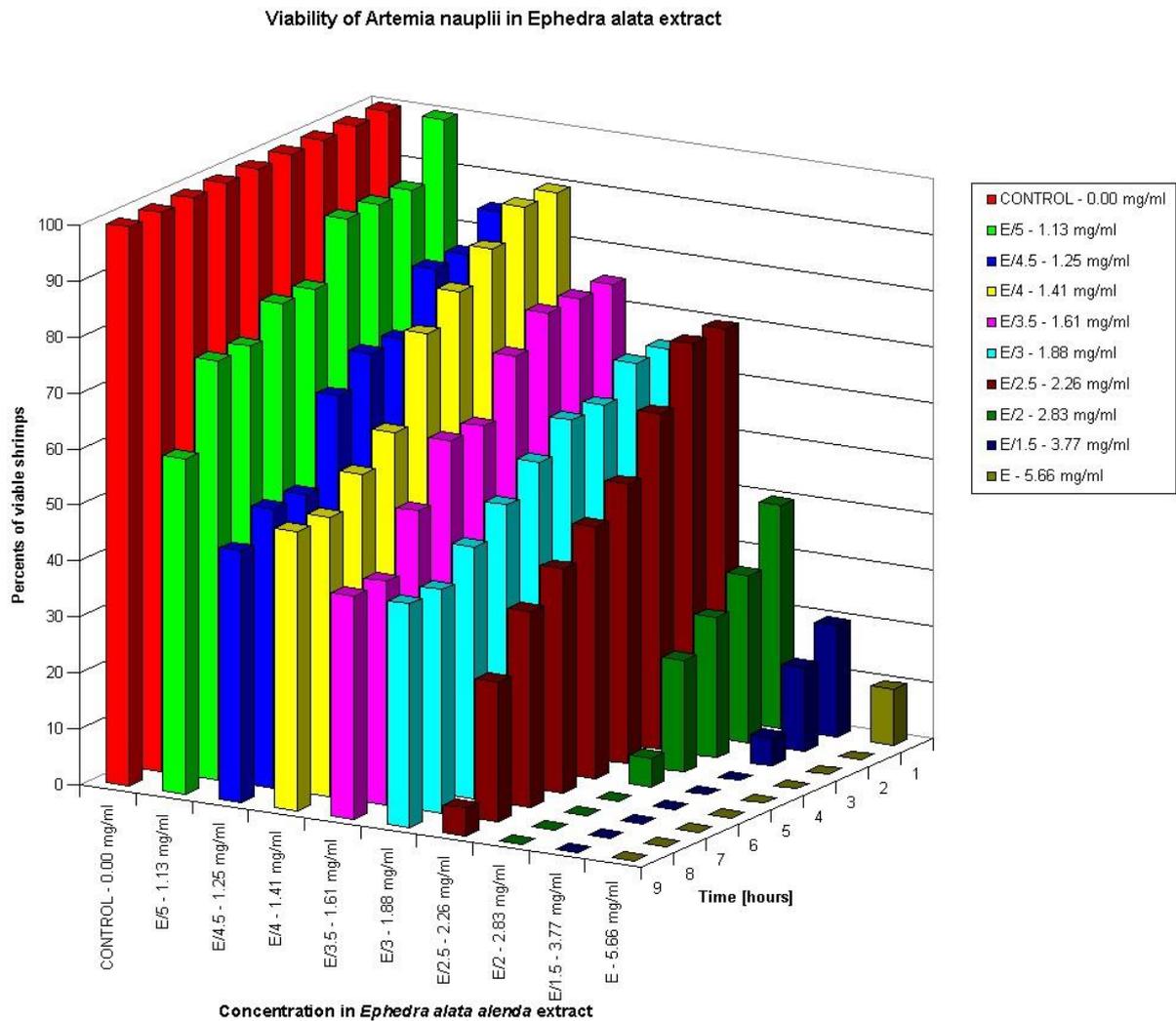
Dried extracts have been used to obtain, for each sample, series of 9 disperse systems in water from Black Sea, in concentrations from E/1 to E/4.5 where denominator increases in steps of 0,5. Biological activity has been tested on shrimps (*Artemia nauplii*). 20 shrimps in first day of life were transferred in each sample vial of series.

### Results

Shrimps were counted every hour on a ten-hour period. In case that viability of shrimp in extractive solutions remained at a high level, observations were continued for another 7 days, and the larvae were counted daily.

Species of *Ephedra* have been quoted frequently for their sympathomimetic action, but some of them have proven antimicrobial and antifungal effects, as well [15]. In our study, there is a strong toxic effect on *Artemia* larvae, at concentrations exceeding 2.83 mg/ml extract in sea

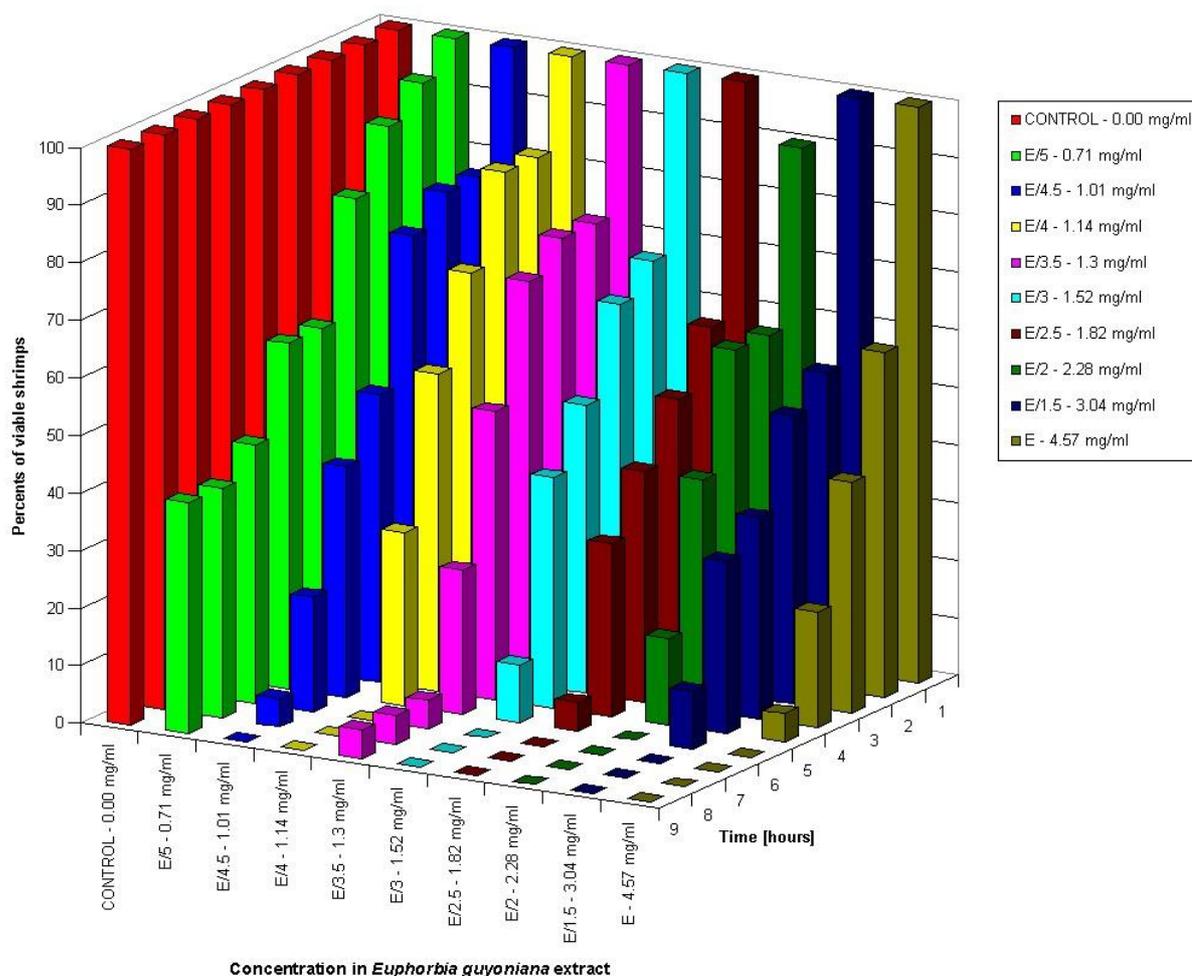
water, when survival rate of larvae is zero, after 6 hours of experiment. Viability of shrimp larvae in extract of *Ephedra alata alenda* is represented in the figure 2.



**Figure 2. Viability of shrimp larvae in extract of *Ephedra alata alenda*.**

A noticeable cytotoxic activity of *Euphorbia guyoniana* is observed at concentrations exceeding E/4.5, when, after 8 hours, shrimp survival rate tends to zero. However, given the chemical composition of species of the genus *Euphorbia*, a vigorous action, even at low concentrations, is expected. On figure 3, we present the shrimp larvae viability in extract of *Euphorbia guyoniana*.

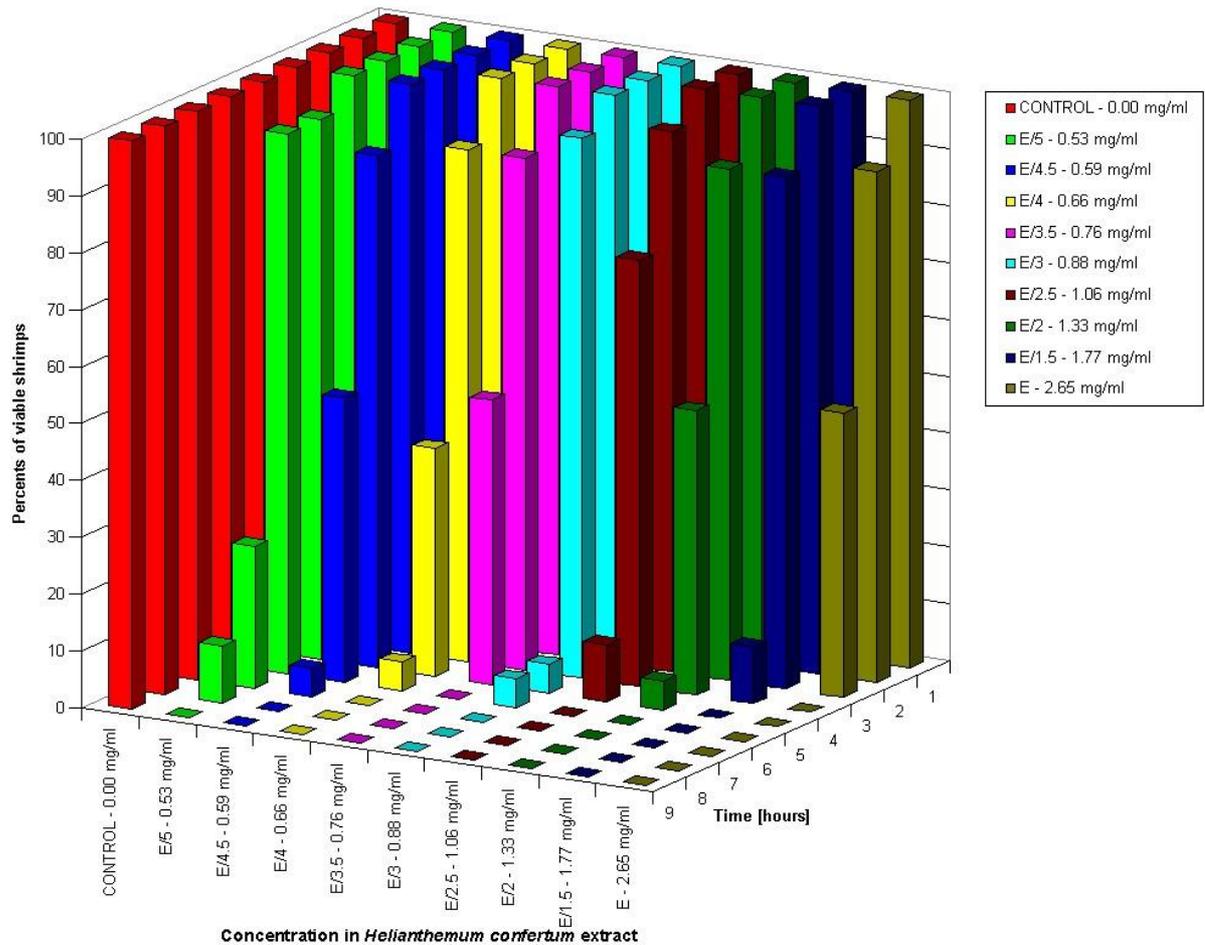
### Viability of *Artemia* nauplii in *Euphorbia guyoniana* extract



**Figure 3. Viability of shrimp larvae in extract of *Euphorbia guyoniana*.**

*Helianthemum confertum* seems to be our most defying species, due to its rarity and to promising results obtained in our experiments, including this one. Underground part of this species shows a strong cytotoxic activity on shrimp, the ir survival rate at highest concentration of extract being zero, after only 4 hours of contact. The figure 4 illustrates the viability of shrimp larvae in extract of *Helianthemum confertum*, especially the extract of the root part.

Viability of *Artemia nauplii* in *Helianthemum confertum* extract (underground part)



**Figure 4. Viability of shrimp larvae in extract of *Helianthemum confertum* (underground part).**

As can be seen, the 3 extracts presented above exhibit a redoubtable cytotoxic action. In these cases, total elimination of viable shrimp is a matter of hours.

In the following, it will be observed that although a certain cytotoxic activity is present, the larvae of *Artemia* shows some resistance, and their complete elimination is achieved in a few days.

In this context, at the maximum concentration of extract of *Anthyllis henoniana*, shrimp larvae are eliminated completely after 3 days of contact. Viability of shrimps larvae in extract of *Anthyllis henoniana* is represented in the figure 5.

Viability of *Artemia* nauplii in *Anthyllis henoniana* extract

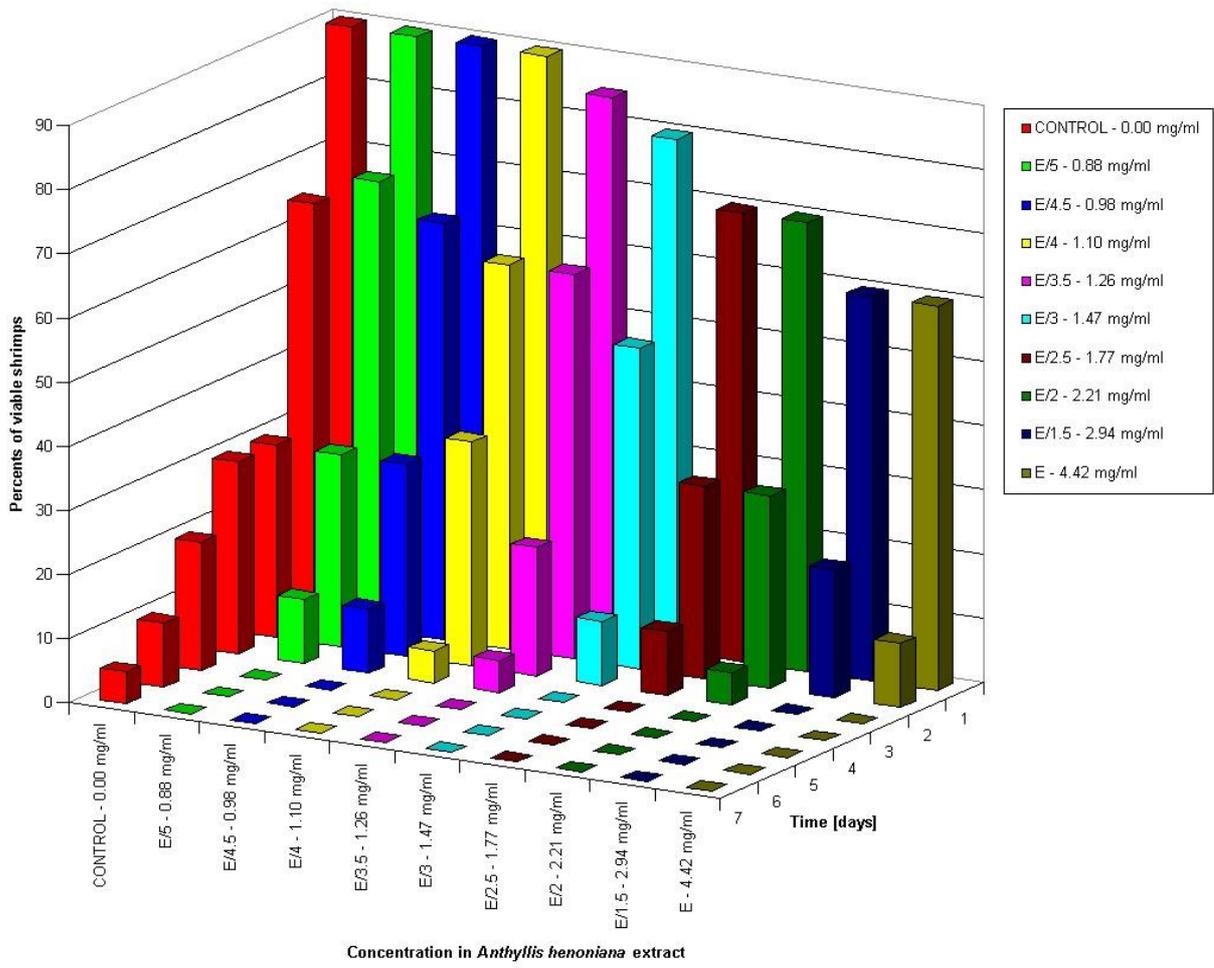
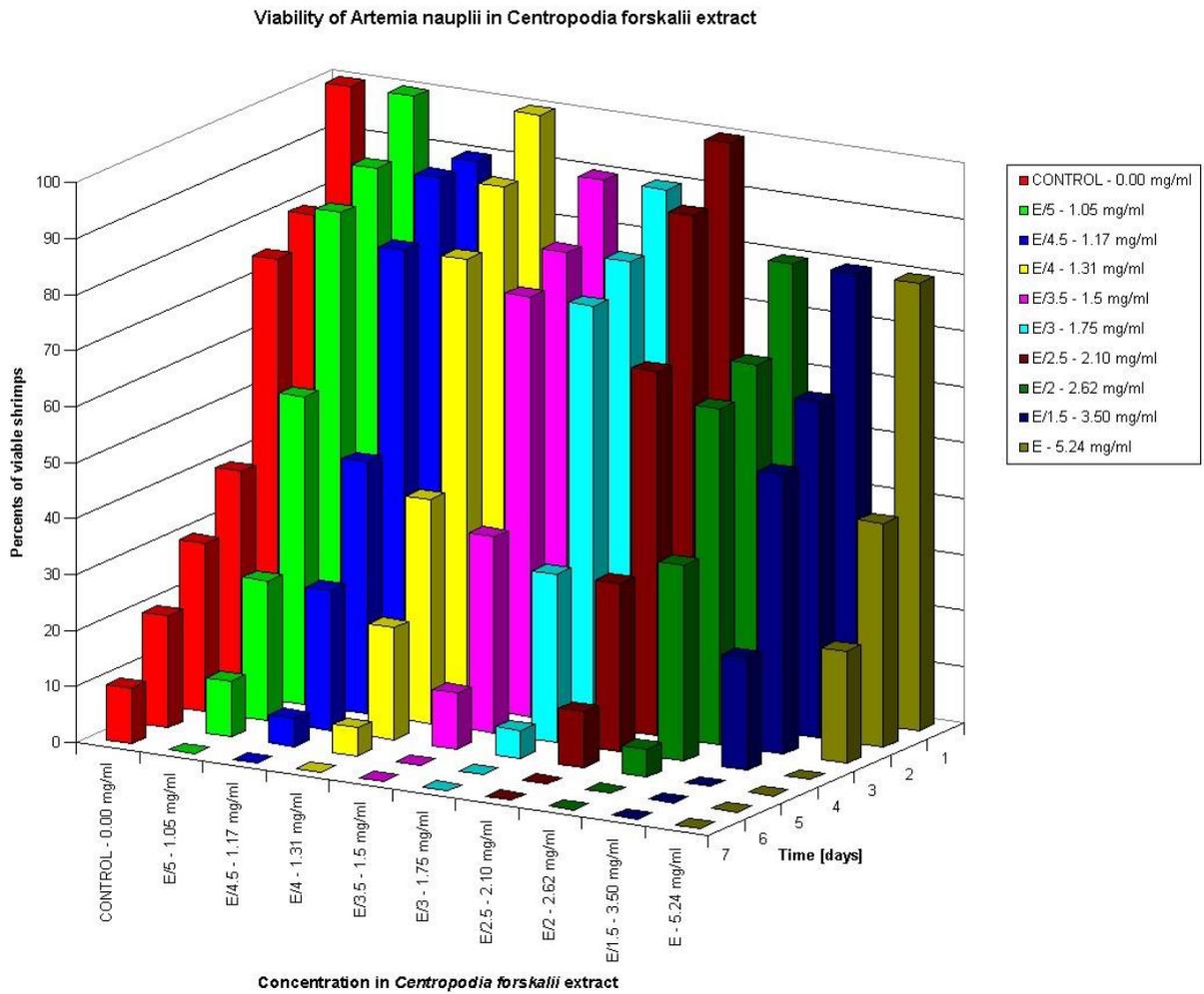


Figure 5. Viability of shrimp larvae in extract of *Anthyllis henoniana*.

The Figure 6 below presents the effect of *Centropodia forsskaolii* on the larvae of *Artemia*. At the maximum concentrations, the used extract lead to the total elimination of larvae, after 3 or 4 days of contact.



**Figure 6. Viability of shrimp larvae in extract of *Centropodia forsskaolii*.**

As we can see on the figure 7, *Henophyton deserti* shows the best cytotoxic activity. In fact, after 2 days, elimination of shrimp is almost completed. The mortality of shrimp larvae in extract of *Henophyton deserti* is fast.

Viability of *Artemia nauplii* in *Henophyton deserti* extract

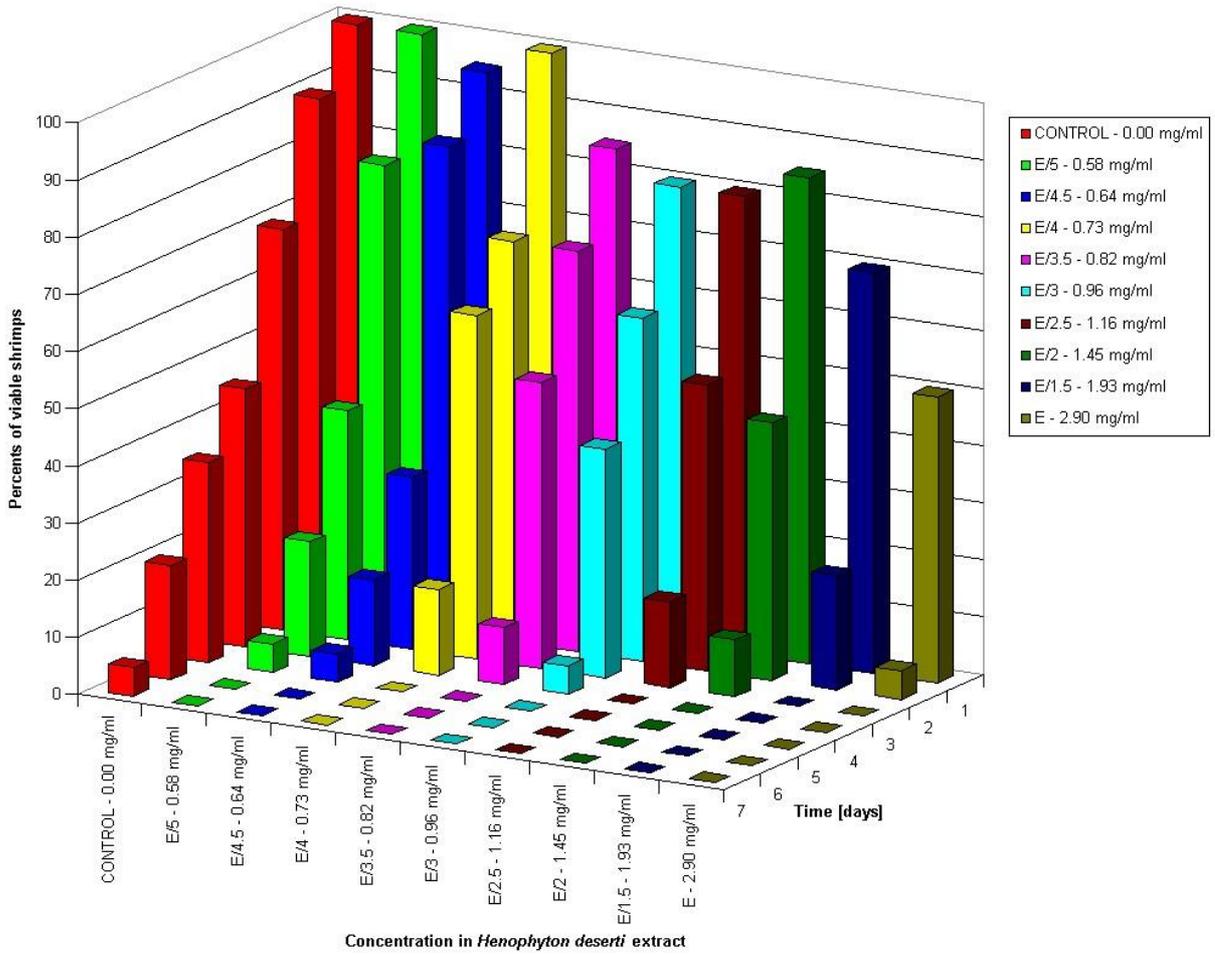


Figure 7. Viability of shrimp larvae in extract of *Henophyton deserti*.

In the case of *Spartidium saharae*, our experiments indicate that, although a certain cytotoxic action can be taken into account, it is relatively low. Moreover, the dependence on the concentration is less relevant (figure 8).

Viability of *Artemia* nauplii in *Spartidium saharae* extract

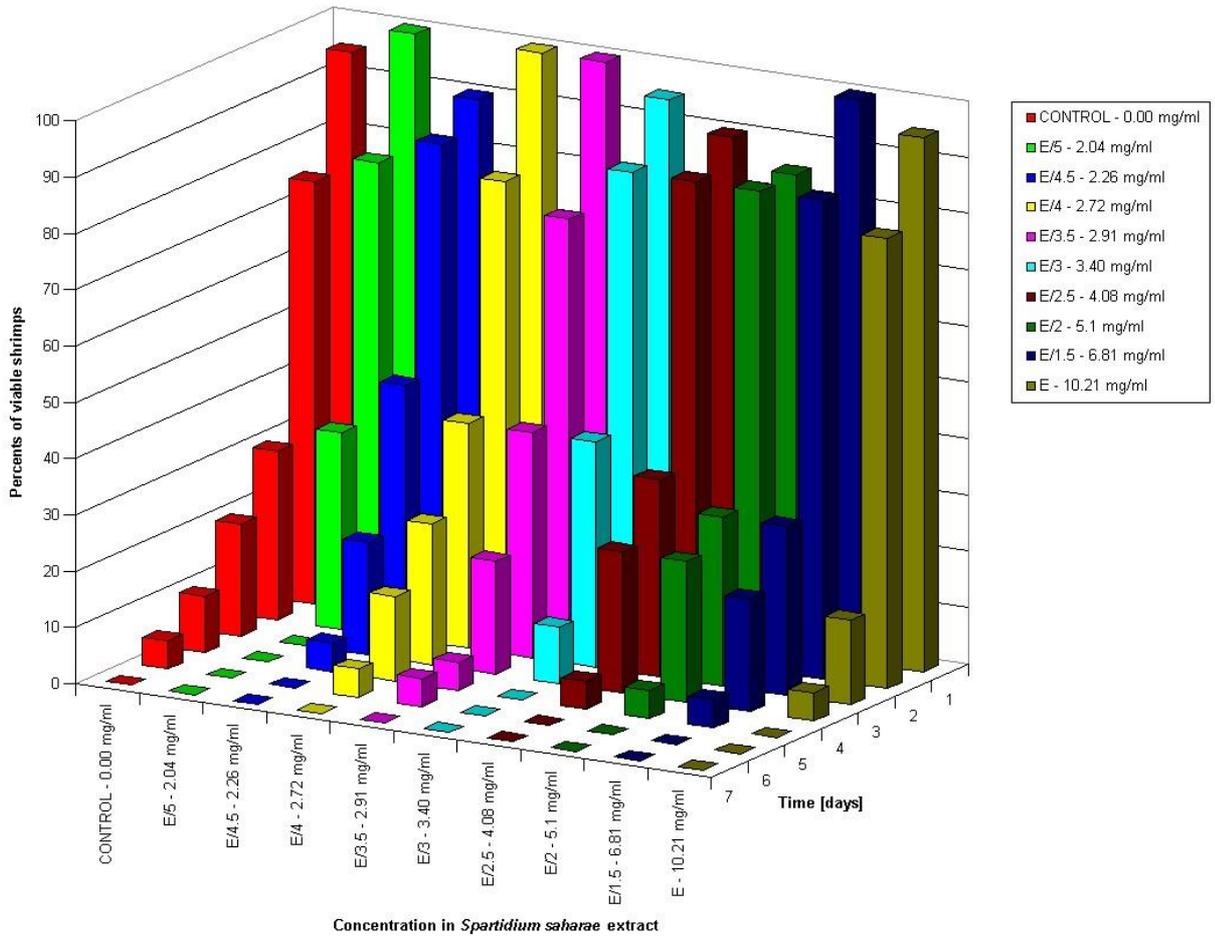


Figure 8. Viability of shrimp larvae in extract of *Spartidium saharae*.

These last four diagrams show that cytotoxic activity does not represent a predilect action of the corresponding species. In these situations, research should be directed towards identifying other biological activities.

**Discussion**

All plant extracts used in this study exhibited notable biological activity, measured as a time-dependent decrease of shrimp viability in the brine shrimp lethality bioassay. This data is either entirely new or it comes to complete an only slightly contoured array on the biological activity of these Saharan species. Among the different Saharan plants employed in this work, *Helianthemum confertum* stands out by far as the most intriguing

representative. This plant is extremely rare; its ecosystem is distant and quite inaccessible. Consequently, there are still important systematic issues to be clarified, as well as aspects of chemical composition and biological activity of this species, some of which have not yet been addressed at all.

*Centropodia forsskaolii* is another interesting species, specific for desert sandy soil and dunes, whose biological potential was incompletely studied. Nevertheless, given that it constitutes a common food for camels, this plant is probably non-toxic and it has, most possibly, some valuable biological effects.

On the other side, biological activity of species like *Henophyton deserti*, or even more so *Ephedra alata alenda* and *Spartidium saharae* have been studied quite extensively. For instance, of particular relevancy is the research on antimicrobial and antifungal activity of *Henophyton deserti* [3], as well as the studies on antimicrobial activity of *Ephedra alata* [15] and on potentially bioactive alkaloids from *Spartidium saharae* [16].

Regarding the species *Anthyllis henoniana*, few relevant data on biological activity are available to date. It was extensively studied in terms of chemical composition and biological activity [17].

Extreme climate conditions are a favorable environment for the biosynthesis of characteristic compounds which, in addition to specific morphological and physiological characteristics, ensure plant survival.

Study of these plants enable us to reveal chemical and morphological determinants that can help unravel and even predict phytochemical characteristics of different species, like biotype-dependent systematic as well as species specific properties.

In this sense, representatives of the genus *Ephedra* whose species are spread across the globe including the Saharan desert were investigated. Species of this genus are known as sympathomimetic. In addition, antimicrobial and antifungal actions have been recently discovered. Moreover, some representatives of genus *Ephedra* show, when combined with

other species, a certain antiviral activity [18]. Also, some studies have shown that *Ephedra pachyclada* Boiss. exhibits significant anti-inflammatory and anti-oxidant properties [19].

As mentioned above, one of the most exciting species included in our study was *Helianthemum confertum*. Species of genus *Helianthemum* can be found in Spain, where in fact the previous investigations on its antimicrobial and antioxidant action have originated. [20]. However as previously reported, these aforementioned bioactivity tends to vary from one species to another and therefore it cannot be automatically extrapolated to *Helianthemum confertum*, the species subjected to our studies. In terms of cytotoxicity, *Helianthemum confertum* (the underground part) may be the most active in our work. Actually, due to our promising results, while also considering the aspect of its scarcity and all other still unresolved, understudied characteristics of this species like spreading area and even issues related to the name of species, *Helianthemum confertum* was the most remarkable species included in this work.

Another Saharan species that tends to clearly stand out in our study is *Euphorbia guyoniana*. It has been reported that the *Euphorbiaceae* family includes multiple species containing bioactive compounds. To date, comprehensive studies aiming at isolation and identification of compounds from *Euphorbia* species, have been carried on [21]. Also, the cytotoxic and antitumor potential of several compounds isolated from *Euphorbia* species have been previously described [22]. It is also important to note that toxicity of *Euphorbia* species is not a minor issue, some species being used for toxic fishing and constituting a particular hazard to humans [23-24].

## **Conclusion**

This study is one of the few studies conducted worldwide on exclusively Saharan species. These very difficult climatic conditions, strongly influence the phytochemicals characteristics. This is justified also by the frequent use of plants species in saharan region by the traditional medicine. Thus, in our work, the species studied are classified into two different groups.

i) Saharan plants with strong cytotoxic activity: *Ephedra alata alenda*, *Euphorbia guyoniana* and *Helianthemum confertum* (underground part), where a notable cytotoxic activity can be observed within a period of 10 hours.

ii) Saharan plants with weak cytotoxic activity: *Anthyllis henoniana*, *Centropodia forsskaolii*, *Henophyton deserti* and *Spartidium saharae*, where a notable cytotoxic activity can be observed within a period of 7 days. Taken all together, our results on biological activity of investigated plants have established a first reference point for future pharmacological studies with the overall goal of putting in value the therapeutic potential of these species.

Acknowledgement : Authors will thank to all peoples involved in this work, especially Dr. Mohamed Sadok Belkadhi and Abdelmajid Ben Farjallah, Arid land Institute of Kebili (Tunisia); Béatrice Baghdikian & Fathi Mabrouki, UFR of Pharmacy, Aix-Marseille University (France); Isabelle Laffont-Schwoob, IMBE-AMU Marseille and Szabadai Zoltán, UMF Timișoara. Also we will thank Adrian Grozav, Cleveland State University (USA), for the article reading and correcting the English.

#### References

- [1] Ourcival J.M, Floret C, Le Floc'h E, Pontanier R. Water relation between two perennial species in the steppes of southern Tunisia. *Journal of Arid Environments*; 1994. V. 28. No 4. P. 333-350.
- [2] Derbel S, Touzard B, Triki M.A, Chaieb M. Seed germination responses of the Saharan plant species *Ephedra alata ssp. alenda* to fungicide seed treatments in the laboratory and the field. *Flora, Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*; 2010. V. 205. No 7. P. 471-474.
- [3] Derbel S, Bouaziz M, Dhouib A, Sayadi S, Chaieb M. Chemical composition and biological potential of seed oil and leaf extracts of *Henophyton deserti* Coss. & Durieu. *Comptes Rendus Chimie* ; 2010. V. 13. No 4. P. 473-480.

- [4] Rédei D, Forgo P, Molnár J, Szabó P, Zorig T, Hohmann J. Jatrophone diterpenoids with multidrug resistance-modulating activity from *Euphorbia mongolica* Prokh. *Tetrahedron*; 2012. V. 68. No 40. P. 8403-8407.
- [5] Judzentiene A, Budiene J, Gircyte R, Masotti V, Laffont-Schwob I. Toxic Activity and Chemical Composition of Lithuanian Wormwood (*Artemisia absinthium* L.) Essential Oils. *Records of Natural Products*; 2012. V. 6. No 2. P. 180.
- [6] Ourcival J.M, Floret C, Le Floc'h E, Pontanier R. Water relations between two perennial species in the steppes of southern Tunisia. *Journal of Arid Environments*; 1994. V. 28. No 4. P. 333 – 350.
- [7] Ghada A.H, Taghried M. Callus Induction and Extraction of Ephedrine from *Ephedra alata* Decne. *Cultures. American – Eurasian Journal Agric. & Environ*; 2011. V. 11. No 1. P. 19-25.
- [8] Parsaeimehr A, Sargsyan E, Javidnia K. A comparative study of the antibacterial, antifungal and antioxidant activity and total content of phenolic compounds of cell cultures and wild plants of three endemic species of *Ephedra*. *Molecules*; 2010. V. 15. No 3. P. 1668-1678.
- [9] Bellakhdar JS. - *La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle*. Paris : ed. Ibis Press; 1997. P. 297-301.
- [10] El Hilali J, Hmammouchi M, Lyoussi B. Ethnobotanical studies and economic evaluation of medicinal plants in Taounate province (Northern Morocco). *Journal of Ethnopharmacology*; 2003. V. 86. P. 149-158.
- [11] Haba H, Lavaud C, Harkat H, Magid A.A, Marcourt L, Benkhaled M. Diterpenoids and triterpenoids from *Euphorbia guyoniana*. *Phytochemistry*; 2007. V. 68. No 9. P. 1255 – 1260.

- [12]Vasas A, Sulyok E, Martins A, Redei D, Forgo P, Kele Z, Zupkó I, Molnár J, Pinke G, Hohmann J. Cyclomyrsinane and premyrsinane diterpenes from *Euphorbia falcata* modulate resistance of cancer cells to doxorubicin. *Tetrahedron*; 2012. V. 68. No 4. P. 1280-1285.
- [13]Hohmann J, Ferenc Evanics F, Dombi G, Szabó P. Salicifoline and salicinolide, new diterpene polyesters from *Euphorbia salicifolia*. *Tetrahedron Letters*; 2001. V. 42. No 37. P. 6581-6584. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040403901012850%20-%20COR1mailto:hohmann@pharma.szote.u-szeged.hu>
- [14]Abdel-Halim O, Abdel-Fttah H, Halaweish F, Halim A. Isoflavonoids and Alkaloids from *Spartidium saharae*. *Natural Product Sciences*. 2000. V. 6 No 4. P. 189-192.
- [15]Ghanem S, El-Magly U.I.A. Antimicrobial Activity and Tentative Identification of Active Compounds from the Medicinal *Ephedra alata* Male Plant “Arabic abstracts” - *Journal of Taibah University Medical Sciences*; 2008. V. 3 No 1. P. 7-15.
- [16]Mekkiou R, Touahar H, Dijoux-franca MG, Mariotte AM, Benayache S, Benayache F. A new isoflavone from *Genista saharae* (*Fabaceae*). *Biochemical Systematics and Ecology*; 2005. V. 33 No 6. P. 635 – 638.
- [17]Adell J, Barbera O, Alberto-Marco J. Flavonoid glycosides from *Anthyllis sericea*. *Phytochemistry*; 1988. V. 27 P. 2967-2970.
- [18]Yen M.H, Lee J.J, Yeh C.F, Wang K.C, Chiang T.W, Chiang L.C, Chang J.S. Yakammaoto inhibited human coxsackievirus B4 (CVB4)-induced airway and renal tubular injuries by preventing viral attachment, internalization, and replication. *Journal of Ethnopharmacology*; 2014. V. 51 No 3. P. 1056-1063.
- [19]Ghasemi M, Azarnia M, Jamali M, Mirabolghasemi G, Nazarian S, Naghizadeh M.M, Rajabi M, Tahamtani Y. Protective effects of *Ephedra pachyclada* extract on mouse

- models of carbon tetrachloride-induced chronic and acute liver failure. *Tissue and Cell*; 2014. V. 46. No 1. P. 78-85.
- [20]Moraga A.R, Aragandona J, Mota B., Perez J, Verde A., Fajardo J, Gomez-Navarro J, Castillo-Lopez R, Ahrazem O, Gomez-Gomez L. Screening for polyphenols, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from eleven *Helianthemum* taxa (Cistaceae) used in folk medicine in south-eastern Spain. *Journal of Ethnopharmacology*; 2013. V. 148 No 1. P. 287-296.
- [21]Sulyok E, Vasas A, Redei D, Dombi G, Hohmann J. Isolation and structure determination of new 4,12-dideoxyphorbol esters from *Euphorbia pannonica* Host. *Tetrahedron*; 2009. V. 65. No 20. P. 4013-4016.
- [22]Tao W-W, Duan J-A, Tang Y-P, Yang N-Y, Li J-P, Qian Y-F. Casbane diterpenoids from the roots of *Euphorbia pekinensis*. *Phytochemistry*; 2013. V. 94 P. 249-253.
- [23]Fai P.B.A, Fagade S. Acute toxicity of *Euphorbia kamerunica* on *Oreochromis niloticus* – *Ecotoxicology and Environmental Safety*; 2005. V. 62. No 1. P. 128-131.
- [24]Tiwari S, Singh A. Piscicidal and anti-acetylcholinesterase activity of *Euphorbia royleana* stem bark extracts against freshwater common predatory fish *Channa punctatus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*; 2004. V. 8. No 1. P. 47-53.

**Tables list:**

Table 1. Summary of biologicals and ecologicals characteristics of the studied species

Table 2. Quantities of dry extracts and value of E for studied species.

**Figures list:**

Figure 1. Sample concentration in relation to E.

Figure 2. Viability of shrimp larvae in extract of *Ephedra alata alenda*.

Figure 3. Viability of shrimp larvae in extract of *Euphorbia guyoniana*.

Figure 4. Viability of shrimp larvae in extract of *Helianthemum confertum* (underground part).

Figure 5. Viability of shrimp larvae in extract of *Anthyllis henoniana*.

Figure 6. Viability of shrimp larvae in extract of *Centropodia forsskaolii*.

Figure 7. Viability of shrimp larvae in extract of *Henophyton deserti*.

Figure 8. Viability of shrimp larvae in extract of *Spartidium saharae*.

## CHAPITRE III

### Antioxidant activity of some Saharan plant species

Palici, Ionut Florin<sup>1 & 4\*</sup>; Judit Hohmann<sup>2</sup>; Chaieb, Mohamed.<sup>3</sup> \* & Touzard, Blaise.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>University of Medicine & Pharmacy Victor Babès, 300041 Timisoara, Romania.

<sup>2</sup>Laboratoire de Pharmacognosie; Faculté de Pharmacie; Szeged; Hungary.

<sup>3</sup>BIOECOS-MA, University of Sfax, Faculty of Sciences, 3000 Sfax, Tunisia.

<sup>4</sup>BIOGECO- University of Bordeaux, 33000 Talence, Brodeaux France.

\* *Corresponding author*

#### Abstract

The purpose of our study is to determine antioxidant activity of some species Saharan Africa. Out of 8 species included in our research, *Euphorbia guyoniana* Boiss., *Moltkiopsis ciliata* (Forssk.) I.M. Johnst., *Henophyton deserti* Coss & Durieu, *Cornulaca monacantha* Delile, *Spartidium saharae* Pomel, *Helianthemum confertum* Dunal (aerial part), *Helianthemum confertum* Dunal (underground part), *Anthyllis henoniana* Coss and. *Ephedra alata* Decne subspecies *alenda* Stapf, only one, namely *Henophyton deserti* Coss & Durieu, is mentioned in the literature as having antioxidant potential.

DPPH method is one of the most convenient at the moment, although it shows some limitations.

Extractive solvents are methanol or a mixture of ethanol / water, being some of the most used today. It is already known and observed in our study, as well, that the nature of the solvent can significantly influence the antioxidant potential of the extract obtained.

The results are satisfactory, 6 of the 8 species exhibiting an antioxidant in the given conditions.

## 1. Introduction

The arid land in southern Tunisia constitutes the favorable environment for the development of species with uncommon morphological and physiological traits.

Resistance to high temperatures and drought constitutes defining characteristics of Saharan plant species, due to some morphological characteristics such as long roots, leaves with thick epidermis, protected by a cuticle, seeds protected by a tegument that provides effective insulation to the external environment and thus the vitality of the embryo, in the extreme conditions of the Sahara [1]. Physiologically, Saharan species presents a relatively quick development cycle corresponding to the alternation of rainy and drought periods. Phytochemically, one can estimate that Saharan species metabolism is geared towards producing secondary metabolites such as to ensure the plant's vital requirements. This fact was confirmed by some studies on plants in dry regions [2].

Regarding the content of antioxidant agents, the existing studies show that their biosynthesis is determined by the radiation that confronts the plant [3]. In the case of the Saharan species, the amount of solar radiation absorbed is superior to all plants living in different ecosystems.

Many Saharan species captured the attention of researchers, these, for the beginning speculating on the existence of metabolic processes which give the viability to these plants, in the existing climate in the Sahara.

As such, despite challenges related to the identification of their habitat, the difficulty in harvesting, some experiments were conducted in order to identify and highlight their biological potential, in correlation with the pharmaceutical and medical demands.

Some authors have conducted studies on species close taxonomically to our species. In such situations phytochemical resemblance, the bibliographic results could be less relevant, because of the different habitats and their inherent differences.

On the other hand, the existence of synonyms of scientific names, could also cause confusion. These tiny obstacles can be overcome through a pertinent literature review.

In this context, we can highlight the **bibliographic research** on some species of *Euphorbia*, namely *Euphorbia biumbellata* Poir., *Euphorbia terracina* L. and *Euphorbia dendroides* L., that showed the antioxidant potential of these species (Zeghad et al. 2016) [4A].

Another species, *Euphorbia hirta* L., having a pantropical distribution, drew the attention of scientific researchers. The evaluation of the antioxidant activity by DPPH method

showed that this species has remarkable antioxidant effects (Basma et al, 2011) [5B].

Another interesting study of some species of *Euphorbia*, confirms their antioxidant potential. The study was conducted on *Euphorbia schimperiana* Scheele, *Euphorbia peplus* L and *Euphorbia cuneata* Vahl. All three species showed remarkable antioxidant activity (Shaker et al., 2015) [6C].

Consequently, existing studies show that the antioxidant action is common in the genus *Euphorbia*, and, as we shall see, *Euphorbia guyoniana* Boiss. is not an exception.

Regarding the species *Henophyton deserti* Coss & Durieu, relevant research on the antioxidant activity are extremely limited. However, on this species were carried out relevant research, which shows, among other biological actions, the remarkable antioxidant potential of the extract obtained from the leaves of this species. In this context, comparative studies on the potential antioxidant extracts of leaves *Henophyton deserti* Coss & Durieu were conducted using solvents with different polarity (Derbel et al., 2010) [7D].

*Ephedra alata* Decne subspecies *alenda* Stapf was studied in terms of antioxidant activity, as well. The methanol, respectively aqueous extracts showed antioxidant properties (Wilt et al., 2011) [8E].

An extremely rare Saharan species, that grows in areas less mapped and less accessible, is *Helianthemum confertum* Dunal. Relevant studies on the biological activity of extracts of *Helianthemum confertum* Dunal are virtually nonexistent, our approach representing the first steps in this regard.

From the standpoint of biological activity, in terms of promising therapeutic potential, this species is most satisfactory. The extracts of the aerial part of this species, but especially those obtained from the underground part, have significant antioxidant activity.

Regarding species *Moltkiopsis ciliata* (Forssk.) I.M. Johnst., our study is the first significant attempt in terms the determination of its antioxidant activity.

The study of the antioxidant activity of the species *Anthyllis henoniana* Coss, is our innovative approach, as well.

The literature does not show positive results on the antioxidant activity of two species in our study, namely *Cornulaca monacantha* Delile and *Spartidium saharae* Pomel.

In fact, as discussed below, our experiences have refuted the existence of a significant antioxidant activity for both species, under given conditions.

Our study is meant to determine the antioxidant capacity of existing compounds in several Saharan species, namely *Euphorbia guyoniana* Boiss., *Moltkiopsis ciliata* (Forssk.) I.M. Johnst., *Henophyton deserti* Coss & Durieu, *Cornulaca monacantha* Delile, *Spartidium saharæ* Pomel, *Helianthemum confertum* Dunal (aerial part), *Helianthemum confertum* Dunal (underground part), *Ephedra alata* Decne subspecies *alata* Stapf. and *Anthyllis henoniana* Coss.

## 2. Material and Methods

The present study highlights the antioxidant properties of some compounds soluble in solvents widely used in the extraction of plant products, such as methanol and the mixture water / alcohol, respectively.

Although the index polarity of the 2 solvents can be estimated to be relatively close, nature solutes can be different more or less sensitive, given that their solubility is determined not only by the polarity solvents but also by the nature of the substance that is subject to dissolution and by their interaction with the solvent molecules, as well.

Practical experience, as well as theoretical knowledge in the field to determine antioxidant activity, shows that EC 50 values and implicitly antioxidant activity, may show considerable variation, predictable in fact, to some extent, according to various extraction parameters, such as pH, temperature and the nature of the solvent used.

The DPPH method is widely used to determine antioxidant activity, it has its limitations, given the many variables that occur in the reaction, including those related to the kinetics of chemical reactions and equilibrium reaction, which should be taken into account.

Therefore, many variants of DPPH method are perfectible, present advantages and disadvantages, but give some indications, often difficult to quantify and standardize, on the antioxidant potential of a plant product. (Xie and Schaich, 2014). [9]

10 grams of dried and ground plant product was extracted by percolation in 100 g of solvent consisting of 50% ethanol in water (v / v), respectively 100 g of methanol for 24 hours. The extracts in ethanol / water were noted EW and the methanolic extracts MeOH. The resulting extract solutions were concentrated by rotary evaporation at 50° C to a volume of 15 ml, and then were subjected to freeze-drying at -40° C.

Stock solutions were prepared in DMSO. 0.140 mL of buffer solution and 0.100 mL of xanthine solution were added to the wells at a final concentration of 33 mM and 0.05 mM, respectively. Extracts were added in appropriate volumes so that the final concentration of DMSO in the assay did not exceed 3.3% of the total volume. The reaction was initiated by automatic addition of 0.050 mL of Xanthine Oxidase solution to a final concentration of 0.006 units/ml. Each extract was tested in triplicate. Allopurinol was used as positive control. The EC<sub>50</sub> values were calculated by analyzing the inhibitory percentage values of each concentration using GraphPad Prism 5.04 software (GraphPad Software Inc.) with nonlinear regression [10]

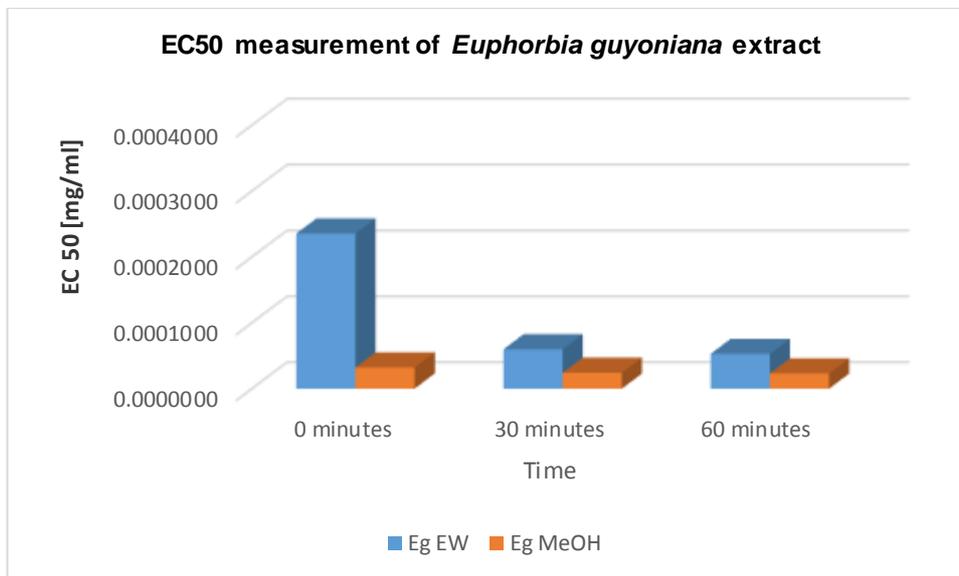
The capacity of the extracts for radical scavenging was tested using the DPPH method. Briefly, the test compound reacts with a stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and the reduction of DPPH is followed by monitoring the decrease of its absorbance at 550 nm using the Fluostar OPTIMA (BMG LABTECH) Fluorescence plate reader in a total volume of 200 µL. Both DPPH and test samples stock solutions were prepared in HPLC grade MeOH at 100 µM and 1 mg/ml, respectively. Samples were added to the wells according to the desired concentration and serially diluted to the following wells. The reaction was started by adding 100 µL of DPPH solution to each well. Decrease in absorbance was determined after 30 and 60 minutes in duplicate. During the reaction period, the mixture was kept away from light. Ascorbic acid was used as positive control [11].

### 3. Results and Discussions

In the present context, relevant results for EC<sub>50</sub> values were obtained only for the samples subjected to a reaction time of 30 minutes. In these conditions, almost all samples showed a measured endpoint and trustworthy curve fittings, except species *Cornulaca monacantha* and *Spartidium Saharae*. In terms of this study, the extracts of these two species have no relevant antioxidant activity.

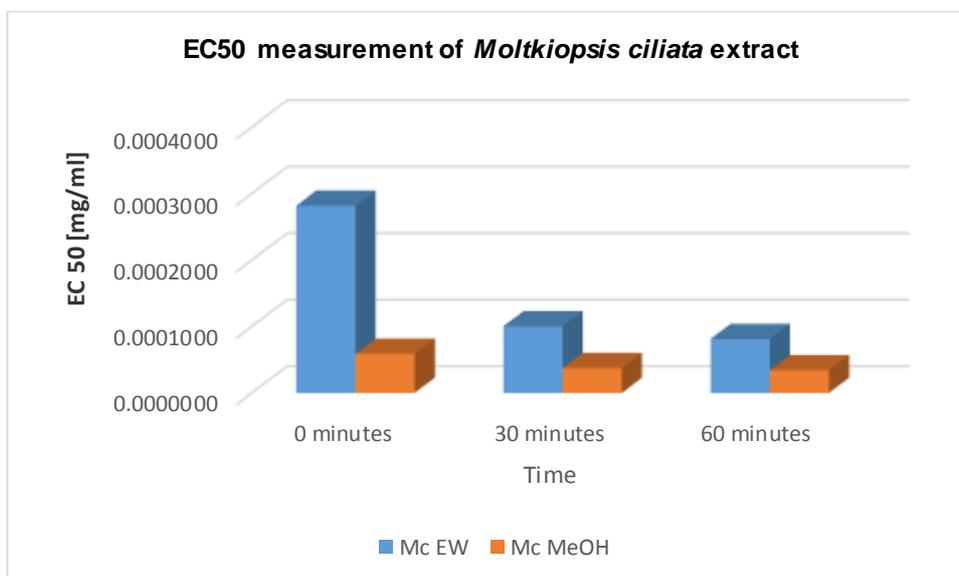
The highest antioxidant activity is encountered in extracts of the underground part of *Helianthemum confertum* Dunal, EC<sub>50</sub> being attained at 0.0024 µg/mL for the ethanol/water extract, 0.0020 µg/mL for the methanolic extract, while the aerial part extracts give values of 0.0031 µg/mL, 0.0026 µg/mL respectively, corresponding to the ethanol/water and methanolic extracts. The values of EC<sub>50</sub> differ considerably between ethanol/water and methanolic extracts. Our data concluded that methanolic extracts show a stronger antioxidant activity than ethanol/water extracts.

*Euphorbia guyoniana* Boiss falls into the category of species with antioxidant potential, like other species of the genus *Euphorbia*, which showed similar properties. (Fig. 1)



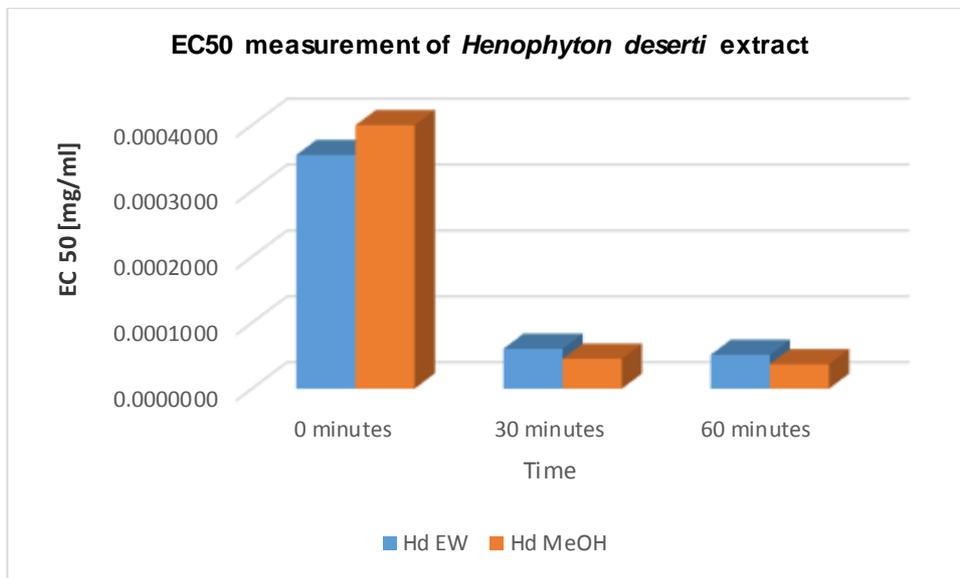
**Figure 1. EC50 measurement of *Euphorbia guyoniana* extract (Eg = *Euphorbia guyoniana* ; EW : ethanol water ; MeOH methanol)**

*Moltkiopsis ciliata* (Forssk.) I.M. Johnst. shows a notable antioxidant activity. Our study is the first relevant in this regard. (Fig. 2)



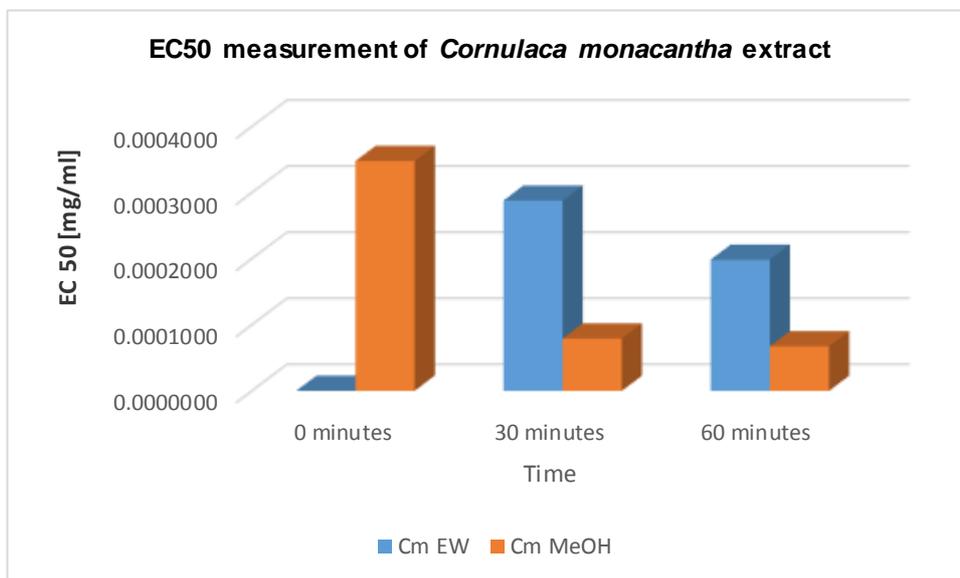
**Figure 2. EC50 measurement of *Moltkiopsis ciliata* extract (Mc = *Moltkiopsis ciliata* ; EW : ethanol water ; MeOH methanol)**

*Henophyton deserti* Coss & Durieu is already known for its antioxidant potential and our study confirms previous studies that, unlike ours, used beta carotene linoleic system for the determination of antioxidant activity [D] (Fig. 3)



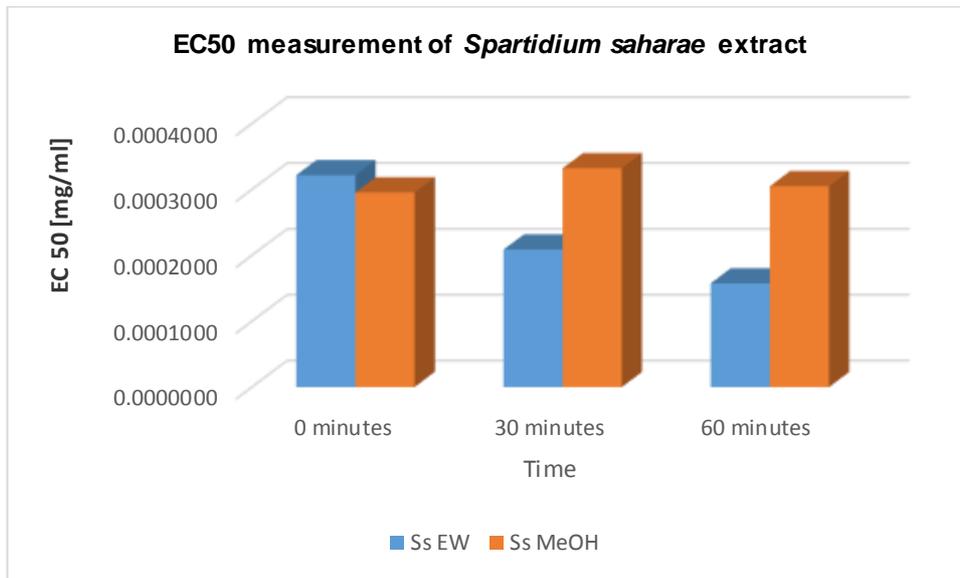
**Figure 3. EC50 measurement of *Henophyton deserti* extract (Hd = *Henophyton deserti* ; EW : ethanol water ; MeOH methanol)**

*Cornulaca monacantha* Delile is one of the species that did not give relevant results in terms of antioxidant activity. (Fig. 4)



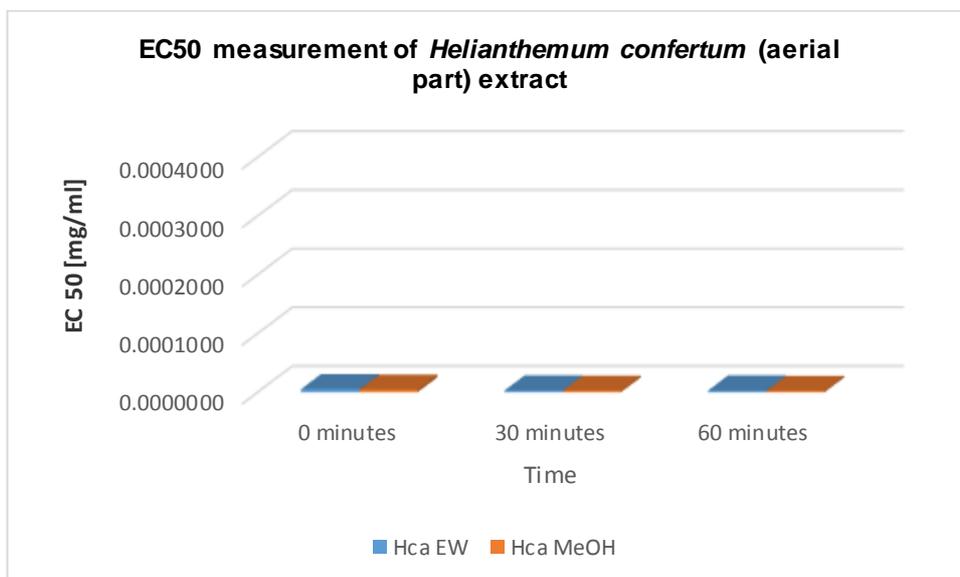
**Figure 4. EC50 measurement of *Cornulaca monacantha* extract (Cm = *Cornulaca monacantha* ; EW : ethanol water ; MeOH methanol).**

*Spartidium saharae* Pomel, under these circumstances, does not fall into the category of species with antioxidant activity. (Fig. 5)



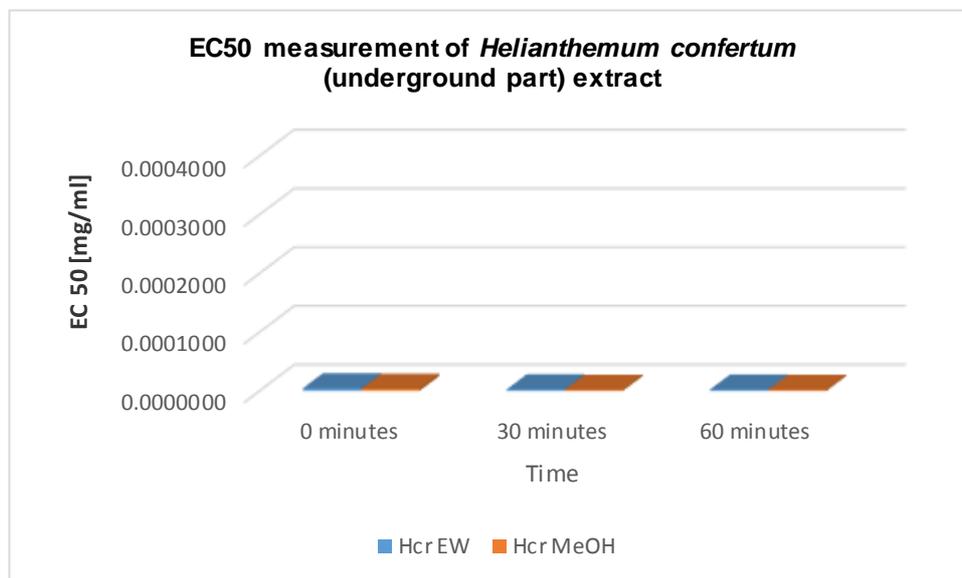
**Figure 5. EC50 measurement of *Spartidium saharae* extract (Ss = *Spartidium saharae* ; EW : ethanol water ; MeOH methanol).**

*Helianthemum confertum* Dunal is a miraculous Saharan species. The habitat of this species occupy remote and difficult to access areas. Our data show, for the firsttime, multiple biological actions, valuable from a therapeutic standpoint, including a notable antioxidant activity. (Fig. 6)



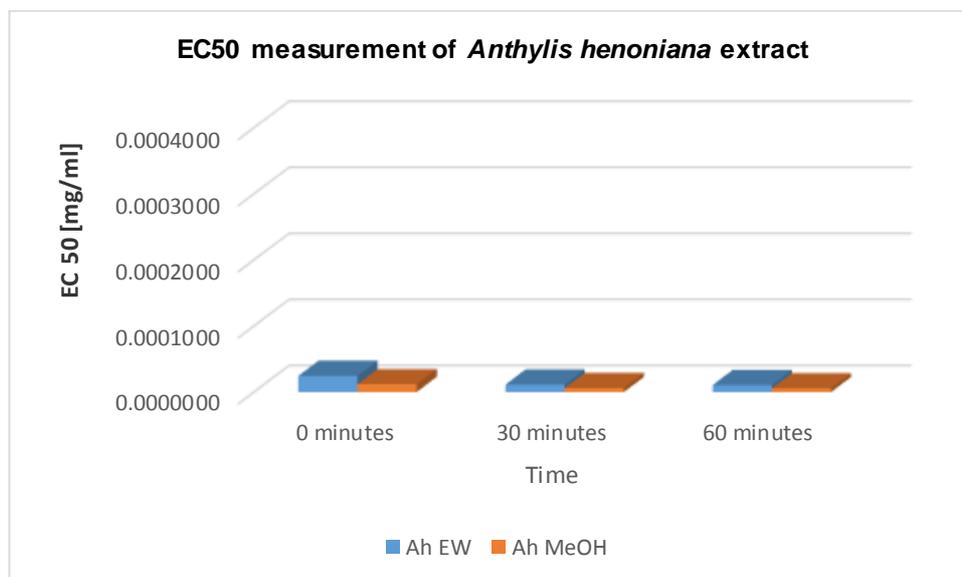
**Figure 6. EC50 measurement of *Helianthemum confertum* (aerial part) extract (Hca = *Helianthemum confertum* aerial part; EW : ethanol water ; MeOH methanol).**

If the aerial species *Helianthemum confertum* Dunal shows extremely valuable characteristics, the underground part surpasses all expectations in terms of biological activity. (Fig. 7)



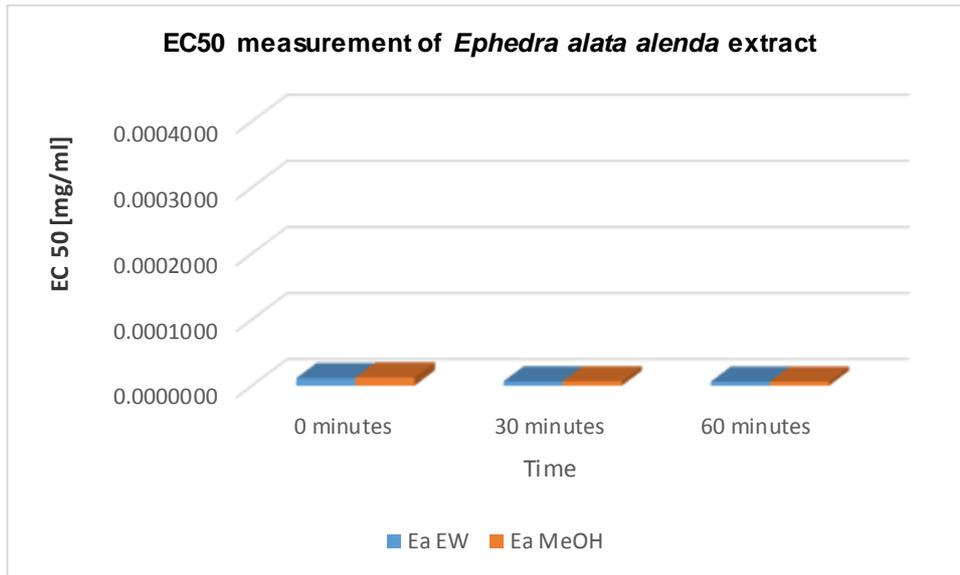
**Figure 7. EC50 measurement of *Helianthemum confertum* (underground part) extract (Hcr = *Helianthemum confertum* underground part ; EW : ethanol water ; MeOH methanol).**

*Anthyllis henoniana* Coss begins to reveal its therapeutic potential. This is the first study that highlights a notable antioxidant activity of this species. (Fig. 8)



**Figure 8. EC50 measurement of *Anthyllis henoniana* extract (Ah = *Anthyllis henoniana* ; EW : ethanol water ; MeOH methanol).**

Numerous species of *Ephedra*, including *Ephedra alata alenda*, were investigated in terms of the antioxidant potential [E]. Our study confirms previous results. (Fig. 9)



**Figure 9. EC50 measurement of *Ephedra alata alenda* extract (Ea = *Ephedra alata-alenda* ; EW : ethanol water ; MeOH methanol).**

#### 4. Conclusions

At least one Saharan plant comprised in our study, namely *Helianthemum confertum* Dunal, presents a strong antioxidant activity. Two species, *Anthyllis henoniana* Coss. and *Ephedra alata* Decne subspecies *alenda* Stapf. could be taken into account as species with antioxidant properties. Extracts of *Euphorbia guyoniana* Boiss., *Moltkiopsis ciliata* (Forssk.) and *Henophyton deserti* Coss & Durieu, even if show a certain antioxidant activity, but other experiments could be performed, for example in the direction of finding the most appropriate solvent.

In the same context, one can observe that the nature of solvent is correlated with the antioxidant effect, which leads to the conclusion that Hydrophile/Lipophile balance of antioxidant substances contained in these plants, needs to be taken into account.

## References

1. Bradai L, Bouallala M, Bouziane NF et al. An appraisal of eremophyte diversity and plant traits in a rocky desert of the Sahara *Folia Geobot* (2015) 50: 239.
2. Sahoo K P, Kasera K Pawan, Sher Mohammed. Secondary metabolites produced during different seasons in some arid medicinal plants. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 2012, 2 (6):650-652
3. Singh A, Sarkar A, Singh S, Agrawal S.B. Investigation of supplemental ultraviolet-B-induced changes in antioxidative defense system and leaf proteome in radish (*Raphanus sativus* L. cv Truthful): an insight to plant response under high oxidative stress. *Protoplasma*. 2010 Sep;245(1-4):75-83 Epub 2010 Apr 18.
4. Zeghad F, Djilani SE, Djilani A, Dicko A. Antimicrobial and antioxidant activities of three *Euphorbia* species *Turk J Pharm Sci*. 2016; 13(1): 22-37
5. Basma AA, Zakaria Z, Latha LY, Sasidharan S. Antioxidant activity and phytochemical screening of the methanol extracts of *Euphorbia hirta* L. *Asian Pac J Trop Med*. 2011 May;4(5):386-90. Epub 2011 Jun 22.
6. Shaker KH, Al Shehri BM, Oteef MDY, Mahmoud FM. Antioxidant Compounds from *Euphorbia schimperiana* Scheele in Aseer Region, Saudi Arabia. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 32(1), May June 2015; Article No. 21, Pages: 117-122
7. Derbel S, Bouaziz M, Dhouib A, Sayadi S, Chaieb M. Chemical composition and biological potential of seed oil and leaf extracts of *Henophyton deserti* Coss. & Durieu *Comptes Rendus Chimie* Volume 13, Issue 4, April 2010, Pages 473–480
8. Alali FQ, Tawaha K, El-Elimat T, Syouf M, El-Fayad M, Abulaila K, Nielsen SJ, Wheaton WD, Falkinham JO, Oberlies NH. Antioxidant activity and total

- phenolic content of aqueous and methanolic extracts of Jordanian plants: an ICBG project, (2007) *Natural Product Research*, 21: 12, 1121 — 1131
9. Xie J, Schaich KM, Re-evaluation of the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Free Radical DPPH Assay for Antioxidant Activity *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2014) 62(19)
  10. Murray EJ, Burden F, Horscroft N, Smith-Burchnell C, Westby M. Knockdown of USP18 Increases Alpha 2a Interferon Signaling and Induction of Interferon-Stimulating Genes but Does Not Increase Antiviral Activity in Huh7 Cells *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, Sept. 2011, p. 4311–4319
  11. Acosta JM, Apigo AM, Borreo MCG, Catli NGJ, Enriquez RCM , Fensantos RAD. Determination of Inhibition Activity of the Antioxidants Ascorbic



# CHAPITRE IV : DISCUSSION GENERALE, COLCLUSIONS & PERSPECTIVES

## 1. DISCUSSION GENERALE

### 1.1. Evaluation de l'activité antibactérienne et anticancéreuse des espèces étudiées

Les résultats relatifs aux essais antibactériens ont confirmé que six des espèces végétales étudiées, présentent une activité antibactérienne remarquable, et ce contre 4 souches bactériennes mises en expérimentation. En outre, une importante activité d'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses a été également observée pour deux extraits.

Ainsi, *Helianthemum confertum* manifeste une activité efficace contre *B. subtilis*, *M. catarrhalis* et *S. aureus*. A côté de l'activité antimicrobienne notable de *H. confertum*, l'extrait de la partie souterraine de ce taxon, montre un effet cytotoxique considérable contre le cancer de l'ovaire d'une lignée cellulaire A2780. Ce résultat est original, dans la mesure où jusqu'ici aucune donnée publiée sur cet intérêt pharmacologique ou phytochimique de *H. confertum* n'a pu être constaté. Il s'agit donc, du premier résultat sur les effets antibactériens et antitumoraux de cette espèce. Néanmoins, des travaux antérieurs signalent que certaines espèces du genre *Helianthemum* manifestent des effets antimicrobiens. Les extraits méthanoliques 80% de *H. manifoldium*, *H. alypoides* et *H. cinereum* ont montré de bonnes activités inhibitrices contre *S. aureus*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *E. coli* et *S. enterica* (Rubio-Moraga et al 2013). D'autres travaux de recherche ont mis en évidence un important effet antibactérien de *H. kahiricum* (Bouzerghoune et al 2013). L'effet cytotoxique de l'espèce *Helianthemum confertum* n'est en revanche pas signalé dans la littérature. Néanmoins, les effets anticancéreux des espèces du genre *Cistus*, taxonomiquement lié au genre d'*Helianthemum*, furent récemment démontrés (Papaefthimiou & al 2014).

L'extrait d'*Ephedra alata* var. *alenda* présente une activité antibactérienne modérée contre trois souches bactériennes et fort effet inhibiteur contre *S. aureus* résistant à la méthicilline. Dans le cas de cette espèce, nos résultats de dépistage de sa capacité antimicrobienne sont en partie en accord avec les résultats rapportés plus tôt. Ghanem et al. (2008), signalent l'effet antibactérien de l'extrait en acétonitrile de *E. alata* contre *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* et *E. coli*. Dans notre étude, l'extrait d'*Ephedra* était inactif contre *P. aeruginosa* et *E. coli*. L'explication probable de cette différence est que, dans nos essais nous avons considéré la sous-espèce *alenda*. Aussi, la nature du solvant utilisé pour l'extraction peut constituer une autre raison de ces différences d'activités.

La présence d'alcaloïdes, dont l'éphédrine et de la pseudoéphédrine, les lignanes, les flavonoïdes et autres composés phénoliques est mentionnée dans les extraits de *E. alata*, mais les composés

responsables de l'activité antibactérienne sont pas identifiés (Nawwar & al 1985). Les effets antimicrobiens d'autres espèces d'*Ephedra* ont également été décrits précédemment. Les extraits en eau/éthanol de *Ephedra intermedia* inhibe la croissance de *S. aureus* avec MIC de 0,5 mg/ml (Jeppesen & al 2012). La Transthorine, considéré comme étant un composé pharmacologiquement actif de *E. transitoria*, a également été identifiée chez *E. alata-alenda*. Cette nouvelle quinoléine alcaloïde présente une activité inhibitrice contre les bactéries communes, comme *E. cloacae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus* (Al-Khalil & al 1998).

Le genre *Euphorbia* est relativement bien étudié comme taxon du règne végétal. Cependant, une espèce moins connue, *E. guyoniana* de ce genre a été testée dans notre travail. Une activité antibactérienne remarquable de son extrait a ainsi été observée. Quelques publications sur les compositions chimiques des *E. guyoniana* existent dans la littérature. Les composés caractéristiques du genre *Euphorbia*, les diterpénoïdes ont été isolés à partir de *E. guyoniana*. D'autres parts, l'Ent-abiétane et le polyester jatrophanes diterpènes ont été identifiés dans les racines et les parties aériennes d'*E. guyoniana* (Haba & al 2009). L'activité pharmacologique de cette espèce a également été signalée. L'activité antibactérienne et l'activité cytotoxique de *E. guyoniana* contre la lignée cellulaire HEK293 ont été démontrées. Ces résultats sont en accord avec nos conclusions (Al-Khalil & al 1998 ; Rubio-Moraga et al 2013).

Les connaissances actuelles sur les espèces de genre *Anthyllis* sont très limitées. Une activité antioxydante des composés phénoliques de deux espèces apparentées, *A. aurea* et *A. vulneraria* est signalée dans la littérature (Amar & al 2007). En revanche, aucune publication sur *A. henoniana*, n'a été constatée. Nos résultats obtenus, constituent donc une première au niveau de l'activité antibactérienne modérée de cette espèce.

A l'exception de la teneur en alcaloïdes pyrrolizidiniques de *Moltkiopsis ciliata*, aucune autre information chimique et biologique de cette espèce n'est disponible dans la littérature (Godevac & al 2014). Dans notre travail, l'extrait éthanolique aqueux de *M. ciliata* manifeste une activité antibactérienne légère contre une souche à Gram négatif, à savoir *M. catarrhalis*.

Par contre, lors de nos investigations, aucune donnée sur l'activité antibactérienne et cytotoxique n'est disponible pour les extraits du reste des espèces, à savoir: *Centropodiaforskalii*, *Cornulaca monacantha*, *Henophyton déserti* et *Spartidium saharae*. Pour le cas d'*Henophyton déserti*, les extraits de graines de cette espèce ont montré une bonne capacité d'inhibition contre *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. enterica* et *B. subtilis* (Rizk & al 1988). L'extrait de pépins contient probablement des composés antimicrobiens spéciaux, n'existant pas dans la partie aérienne.

## 1.2. Evaluation de l'activité toxique des espèces étudiées

Rappelons que dans cette partie de notre travail, nous avons testé l'effet toxique des extraits des espèces retenues sur des larves d'*Artemia nauplii*. Il s'agit d'organismes marins, souvent utilisés dans des essais toxicologiques.

Les principaux résultats obtenus, ont permis de constater que tous les extraits de plantes utilisées dans cette étude montrent une certaine activité toxicologique, qui se manifeste par la diminution en fonction du temps, de la viabilité des larves d'*Artemia nauplii*. De tels résultats, constituent un nouveau apport à la science, dans la mesure où aucune de ces espèces végétales sahariennes ne fut utilisée auparavant pour des essais toxicologiques sur *Artemia nauplii*.

En effet, parmi toutes les espèces étudiées, *Helianthemum confertum* Dunal, se révèle comme étant une espèce très toxiques pour les larves d'*Artemia*, en particulier pour l'extrait de sa partie souterraine. Ce constat est également identique à l'efficacité de ce taxon sur la croissance des cellules tumorales (Palici & al 2015). Ceci laisse supposer l'existence d'une relation directe entre son activité toxique et son activité anticancéreuse. *Centropodia forskalii* est une autre espèce intéressante au sein des écosystèmes dunaires sahariens. Il s'agit également d'une espèce presque pas du tout étudiée auparavant (Derbel 2012), d'où l'intérêt de la connaissance de ses activités biologiques. Concernant son effet toxique, aux concentrations maximales, l'extrait de ce taxon provoque la mortalité totale des larves, à peine au bout de 3 à 4 jours d'incubation.

En revanche, l'activité biologique des espèces telles que *Henophyton deserti*, mais surtout *Ephedra alata alenda* et *Spartidium saharae* a été auparavant étudiée. On cite à ce propos, les travaux relatifs à l'activité antimicrobienne et antifongique d'*Henophyton deserti* (Derbel & al, 2010), ainsi que ceux relatifs à l'activité antimicrobienne d'*Ephedra alata* de Ghanem & al, (2008) et enfin les recherches de Mekkiou & al, (2005) sur les alcaloïdes potentiellement bioactifs chez *Spartidium saharae*.

En ce qui concerne l'activité biologique d'*Anthyllis henoniana*, peu de données pertinentes sur ce taxon sont disponibles. Cependant, une espèce du même genre, à savoir *Anthyllis sericea*, a été largement étudiée en termes de sa composition chimique et son activité biologique (Adell & al 1988).

Il est à signaler que les conditions climatiques extrêmes constituent un environnement favorable à la biosynthèse des composés phytochimiques, qui, en plus de leur influence sur les caractéristiques morphologiques et physiologiques adaptatives, assurent la survie des organismes végétaux. En ce sens, le genre *Ephedra*, dont les espèces sont réparties à travers le monde, y compris dans le désert, constitue un exemple typique de cette adaptation. Les espèces de ce genre

sont connues comme étant des sympathomimétiques. En outre, des vertus antimicrobiennes et antifongiques, ont été récemment découvertes tels que nous l'avions précédemment mentionné. En outre, certains représentants du genre *Ephedra* montrent en plus, une activité antivirale (Yen & al, 2014). A ce propos, plusieurs études montrent que *Ephedra pachyclada* Boiss. manifeste des propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydantes. (Ghasemi & al, 2014).

Tel que nous l'avions déjà signalé, *Helianthemum confertum* est l'une des espèces les plus prometteuses au niveau pharmacologique. En effet, en Espagne, certaines espèces du même genre ont fait l'objet d'études de leur l'activité antimicrobienne et antioxydante (Moraga & al, 2013). Ces résultats encourageants, diffèrent d'une espèce à l'autre, et ne peuvent donc pas être extrapolés à l'espèce *confertum*. En termes d'activité cytotoxique de la partie souterraine, *H. confertum* est considéré parmi les espèces les plus actives dans notre étude. Cependant, en raison de la rareté de cette espèce dans les régions sahariennes, il serait nécessaire dans un objectif de sa préservation mais aussi de son exploitation, de réfléchir à sa multiplication par des plantations artificielles dans son biotope. Une autre espèce saharienne prometteuse est *Euphorbia guyoniana*. En effet, tel qu'il est couramment rapporté, la famille des *Euphorbiaceae* comprend de nombreuses espèces qui contiennent des substances biologiquement actives, et certaines sont même très toxiques. Des études plus approfondies ont été menées en vue de l'isolement et l'identification de composés provenant d'espèces du genre *Euphorbia* (Sulyok & al, 2009). Le potentiel cytotoxique anti-tumoral de certains composés d'espèces du genre *Euphorbia* a déjà été révélés par Tao & al, (2013). Toutefois,

La toxicité des espèces du genre *Euphorbia* est à considérer avec sérieux. Ainsi, certaines espèces toxiques sont utilisées par l'homme en dépit de cette toxicité (Fai & al, 2005).

Enfin, l'activité cytotoxique des espèces sahariennes constatée dans cette étude peut constituer un point de départ pour effectuer des études pharmacologiques plus détaillées, afin de mettre en valeur leur potentiel thérapeutique.

### **1.3. Activité anti-oxydante des espèces retenues**

En ce qui concerne les essais antioxydants, des résultats pertinents pour les valeurs d'EC50 ont été obtenues uniquement pour les échantillons soumis à un temps de réaction de 60 minutes. Dans ce contexte, presque tous les échantillons ont montré une activité antioxydante à l'exception de *Cornulaca monacantha* et *Spartidium saharae*. Les extraits de ces deux espèces ne semblent avoir aucune activité antioxydante dans les conditions expérimentales actuelles.

L'activité antioxydante la plus élevée est constatée pour les extraits de la partie souterraine de d'*Helianthemum confertum*, EC50 et ce à 0,0024 µg / mL pour l'extrait etanol / eau, et à 0,0020 mg / mL pour l'extrait méthanolique. Pour les extraits de la partie aérienne de cette espèce, EC50

est obtenu avec des valeurs de 0,0031 µg / mL, pour l'extrait éthanol/eau et 0.0026 µg / mL, pour extraits méthanoliques.

Les valeurs de EC50 diffèrent ainsi considérablement entre l'éthanol / eau et extraits méthanoliques. Nos résultats révèlent ainsi que les extraits méthanoliques présentent une activité anti-oxydante plus forte que les extraits en éthanol / eau.

Dans le cadre de notre travail, *Euphorbia guyoniana* manifeste un potentiel antioxydant, identique aux autres espèces du même genre. *Molteniopsis ciliata* présente une activité anti-oxydante notable, constituant ainsi un résultat nouveau pour la science pour ce taxon. *Henophyton deserti* est déjà connu pour son potentiel antioxydant. Notre étude confirme de fait des études antérieures qui, contrairement à la nôtre, ont utilisé le système bêta-carotène linoléique pour la détermination de l'activité antioxydante de cette espèce (Derbel et al, 2010). *Cornulaca monacantha* et *Spartidium saharae* sont des espèces n'ayant presque pas d'activité antioxydante.

Notre travail met en évidence une activité anti-oxydante pour *Anthyllis henoniana*. Ce constat est original pour cette espèce strictement saharienne, et présume un rôle pharmacologique futur de ce taxon. En ce qui concerne *Ephedra alata-alenda*, la forte activité anti-oxydante constatée dans notre travail, est déjà signalée par Zeghad et al (2016), pour d'autres espèces du même genre.

## 2. CONCLUSION GENERALE

Le présent travail constitue une contribution à l'étude des activités biologiques de certaines espèces végétales sahariennes d'Afrique du nord. Ces espèces furent collectées au printemps 2013 de la Tunisie méridionale, et plus précisément dans des régions situées dans des endroits difficilement accessibles à l'homme. En outre, de point de vue de leur abondance, certaines de ces espèces sont rarissimes, telles que le cas d'*Helianthemum confertum*, *Ephedra alata-alenda* et *Centropodia forsskalii*. Par ailleurs, en raison du manque de données disponibles dans la littérature, et qui sont relatives à leurs activités biologiques, ce travail peut être considéré comme étant l'un des travaux les plus exhaustifs, riches en informations originales. Ces dernières peuvent donc constituer des acquis pour ces régions sahariennes, où les populations locales, sont souvent à la recherche de nouvelles sources de revenus.

En effet, les principaux résultats obtenus, révèlent que les activités antimicrobiennes et anticancéreuses de ces espèces sahariennes ont été clairement démontrées contre les bactéries Gram+ et Gram-, ainsi que les cellules humaines cancéreuses. A ce propos, les parties souterraines d'*Helianthemum confertum*, qui montrent une activité anti-cancéreuse, élément fondamentalement important pour la guérison des maladies cancéreuses.

Parallèlement, l'activité antibactérienne des espèces étudiées, notamment le cas d'*Helianthemum confertum* et *Ephedra alata-alenda* constitue un résultat original pour ces espèces sahariennes. Ce constat ouvre la voie à d'autres axes de recherche, en vue d'une meilleure valorisation pharmacologique de ces espèces auparavant peu ou pas connues pour leurs vertus thérapeutiques. Néanmoins, un complément de recherche serait nécessaire afin de mieux les connaître. On cite à ce propos, la nécessité d'envisager des essais biologiques sur des cellules tumorales, afin de cerner l'effet de ces espèces sur ces tissus tuméfiés., et vois par conséquent leur activité antitumorale sur des tissus contaminés par des cellules cancéreuses.

Les espèces végétales sahariennes constituent une source prometteuse contre les infections bactériennes et les agents tumoraux. Ceci peut constituer une voie de leur valorisation future aux services de l'humanité.

Au niveau cytotoxique, nos résultats montrent aussi une importante activité des espèces étudiées, ce qui laisse penser que certaines d'entre-elles peuvent être utilisées contre les parasites nuisibles. En effet, les résultats de ce volet de recherche constituent un nouvel acquis pour la science. En outre, s'agissant de l'une des rares études menées dans le monde entier sur les espèces exclusivement sahariennes, il y a lieu de rappeler que les conditions climatiques sahariennes influencent fortement les caractéristiques phytochimiques des espèces. Cela se justifie d'ailleurs par l'utilisation en médecine traditionnelle des espèces de plantes dans la région saharienne. Ainsi, dans le cadre nos recherches, les espèces étudiées sont classées en deux groupes différents.

- ❖ Espèces sahariennes avec une activité cytotoxique forte: *Ephedra alata alenda*, *Euphorbia guyoniana* et *Helianthemum confertum* (partie souterraine), où une activité cytotoxique notable a pu être observée après environ 10 heures de traitement.
- ❖ Espèces sahariennes avec une faible activité cytotoxique: *Anthyllis henoniana*, *Centropodia forsskaolii*, *Henophyton déserti* et *Spartidium saharae*, où une activité cytotoxique notable a pu être observée dans un délai de 7 jours.

Au terme de cette étude, au moins une espèce saharienne, à savoir *Helianthemum confertum*, présente une activité antioxydante forte. *Anthyllis henoniana* et *Ephedra*

*alata-alenda* peuvent être considérés comme étant des espèces ayant des propriétés anti-oxydantes moyennes. En dépit de la faible activité anti-oxydante constatée ici pour les extraits d'*Euphorbia guyoniana*, *Moltkiopsis ciliata* et *Henophyton deserti*, il y a lieu la suggestion d'optimiser les conditions d'extraction, par l'emploi d'autres solvants et d'autres concentrations afin de conclure définitivement leur pouvoir anti-oxydant.

Toutefois, ces conclusions restent quand même assez préliminaires, avant d'entreprendre toute initiative d'application à l'échelle humaine.

### 3. PERSPECTIVES

En ce qui concerne l'activité anticancéreuse, l'extrait de partie souterraine d'*Helianthemum confertum*, qui dispose des propriétés inhibitrices sur la croissance des cellules, laisse penser que cette espèce mérite un complément d'études phytochimiques plus détaillées, ainsi que des études pharmacologiques, afin d'identifier les composés responsables de son effet antiprolifératif. Ceci pourrait constituer une voie de recherche de principes actifs, capables de constituer un apport gigantesque pour l'humanité.

Pour les autres espèces, il serait nécessaire de poursuivre les investigations relatives à leurs propriétés chimiques et pharmacologiques avant de tirer toute conclusion définitive.

Enfin, considérant l'intérêt de la flore saharienne, le screening d'autres espèces est nécessaire en vue de leur meilleure valorisation au profit de l'humanité.

## Références bibliographiques

- Abdallah, L. Chaieb, M. 2007. Water status and growth phonology of a Saharan shrub in North Africa. *African Journal of Ecology*, 45, 80-85.
- Abdel-Halim, O. Abdel-Fttah, H. Halaweish, F and Halim, A. 2000. Isoflavonoids and Alkaloids from *Spartidium saharae*. *Natural Product Sciences*. V. 6 No 4. P. 189-192.
- Abourashed, A. El-Alfy, T.I. Abir-Khan, A. Walker, L. 2003. Ephedra in Perspective A Current Review. *Phytother. Res.* 17, 703-712.
- Acosta JM, Apigo AM, Borreo MCG, Catli NGJ, Enriquez RCM, Fensantos RAD. *Determination of Inhibition Activity of the Antioxidants Ascorbic Acid and  $\alpha$ -Tocopherol Using DPPH Assay* College of Pharmacy, University of the Philippines Manila.
- Adell, J. Barbera and O. Alberto-Marco, J. 1988. Flavonoid glycosides from *Anthyllis sericea*. *Phytochemistry*. 27: 2967-2970.
- Ahmed, A.A. Gherraf, N. El-Bassuony, A.A. Rhouati, S. Gad, M.H. Ohta, S. Hirata, T. 2006. Guyonianin A and B, 2 polyester diterpenes from Algerian *Euphorbia guyoniana*. *Natural Product Communications*, 1, 273-279.
- Akrout A., Gonzalez L.A., El Jani H.J., Madrid P.C., 2011. Antioxidant and *antitumor activities of Artemisia campestris* and *Thymelaea hirsuta* from southern of Tunisia. *J. Food. Chem. Tox.*; 49: 342-347.
- Alali, F. Q. Tawaha, K. El-Elimat, T. Syouf, M. El-Fayad, M. Abulaila, K. Nielsen, S. J. Wheaton, W. D. Falkinham, J. O. Oberlies, N. H. 2007. Antioxidant activity and total phenolic content of aqueous and methanolic extracts of Jordanian plants: an ICBG project. *Natural Product Research*, 21(12), 1121-1131, DOI:10.1080/14786410701590285.
- Alberto Marco, J. Adell, J. Barbera, O. Strack, D. & Wray, V. 1989. Two isorhamnetin triglycosides from *Anthyllis sericea*. *Phytochemistry* 28, 1513-1516.
- Albouchi, A. Sebei, b.H. Mezni, M.Y. & El Aouni, M.H. 2001. Influence de la durée d'acclimatation sur l'endurcissement à la sécheresse d'*Acacia cyanophylla* Lindl. *Ann. For. Sci.* 58: 519-528.
- Al-Jaber, Nabila, A.A. Mujahid, Tasneem, G. Al-Hazimi, Hassan, M.G. 1991. Pentacyclic triterpenoids from *Cornula camonacantha*. *Journal of the Chemical*

- Al-Khalil, S. Alkofahi, A. El-Eisawi, D. Al-Shibib, A. 1998. Transthorine, a new quinoline alkaloid from *Ephedra transitoria*. *Journal of Natural Products*, 61, 262-263.
- Ali, S.S. Kasoju, N. Luthra, A. Singh, A. Sharanabasava, H. Sahu, A. Bora, U. 2008. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol Interact*, 160: 1–40.
- Aline oliveira da conceição., 2010. Effet d'extraits de plantes médicinales sur la différenciation cellulaire et le transport du calcium par les cellules syncytiotrophoblaste-like humaines. Thèse de doctorat de l'université du Québec à Montréal.
- Amar, Z. Labib, S.N. Nouredine, G. Salah, R. 2012. Phytochemical screening of five Algerian plants and the assessment of the antibacterial activity of two extracts *Euphorbia guyoniana*. *Pharmacia Letter*, 4, 1438-1444.
- Amer, M.A. Dawidar, A.M. Fayez, M.B. 1974. Constituents of local plants. XVII. The triterpenoid constituents of *Cornula camonacantha*. *Planta Med.* 289 p.
- Anyinam C., 1995. Ecology and ethnomedicine: exploring links between current environmental crisis and indigenous medical practices. *Social Science and Medicine*; 4: 321-329.
- Appendino, G. Spagliardi, P. Ballero, M. Seu, G. 2002. Macrocyclic diterpenes from *Euphorbia hyberna* L. subsp. *Insularis* and their reaction with oxyphilic reagents. *Fitoterapia* 73, 476–582.
- Baratto M C., Tattinib M., Galardic C., Pinellie P., Romanic A., Visiolid F., Basosia R., Pogni R., 2003. Antioxidant activity of galloyl quinic derivatives isolated from *P. lentiscus* Leaves. *Free Radic Res.*; 37 (4), 405-412.
- Basma AA, Zakaria Z, Latha LY, Sasidharan S. Antioxidant activity and phytochemical screening of the methanol extracts of *Euphorbia hirta* L. *Asian Pac J Trop Med.* 2011 May;4(5):386-90. Epub 2011 Jun 22.
- Bauer, A.W. Kirby, W.M.M. Sheriss, J.C. Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility

testing by standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45, 493-496.

Belkhodja, K. Bortoli, L. Cointepas Jean-Paul, Dimanche, P. Fournet André, Jacquinet, J.C. Mori Auguste. Les Sols de la Tunisie septentrionale. Billetn de la Division des Sols (DRES), N°5, 187 p.

Bellakhdar, J.S. 1997. *La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle*. Paris : ed. Ibis Press; P. 297-301.

Belloum M., Bouheroum F., Benayache H., Benayache S., (2013). Secondary metabolites from the aerial part of *Inula crithmoides*. *Chemistry of Natural Compounds*; 17(5): 54- 61.

Benkhmigue O., Zidane L., Fadli M., Elyacou H., Rochdi A., DouiRa A., 2011. Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Mechraâ Bel Ksiri (Région du Gharb du Maroc). *Acta Bot. Barc.* ; 53: 191-216.

Bentabet N., Boucherit-Otmani Z., Bouchent K., 2014. Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie. *Springer Pharmacognosie*. ISSN 1765-2847. *Biology*, 100: 84-91.

Boual Z., Kemassi A., Oudjana H.A., Michaud P., Didi OE., 2013. Caractérisation partielle des polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *malva parviflora* I. (malvaceae): activité prébiotique. Université Kasdi Merbah- Ouargla, Laboratoire Protection des écosystèmes en zones arides et semi- arides, p41.

Bouanani S., Henchiri C., Migianu-Griffoni E., Aouf N., Lecouvey M., 2010). Pharmacological and toxicological effects of *Paronychia argentea* in expérimental calcium oxalate nephrolithiasis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*; 129(1), 38-45.

Bouaziz, M. Dhouib, Loukil, A. Boukhris, M. Sayadi, S. 2009. Polyphenols content, antioxidant and antimicrobial activities of extracts of some wild plants collected from the south of Tunisia. *African Journal of Biotechnology*, 8(24), 7017-7027.

Boudiar, T. Lakhal, H. Khalfallah, A. Kabouche, A. Kabouche, Z. Brouard, I. Bermejo, J. Bruneau, C. 2010. A new alkaloid and flavonoids from the aerial parts of

*Euphorbia guyoniana*. Natural Product Communications, 5(1), 35-37.

- Boufennara, S. Lopez, S. Bousseboua, H. Bodas, R. and Bouazza, L. 2012. Chemical composition and digestibility of some browse plant species collected from Algerian arid rangelands. Spanish Journal of Agricultural Research 1: 88-98.
- Bouhadjera, K. Kebir, T. Baba-Ahmed, A. Bendahou, M. 2005. J. Bio. Sci. 8,834.
- Bouzergoune, F. Bitam, F. Aberkane, M.C. Mosset, P. Fetha, M.N.H. Boudjar, H. Aberkane, A. 2013. Preliminary phytochemical and anti microbial activity investigations on the aerial parts of *Helianthemum kahiricum*. *Chemistry of Natural Compounds*, 49, 751-752.
- Bradai L, Bouallala M, Bouziane NF et al. An appraisal of eremophyte diversity and plant traits in a rocky desert of the Sahara Folia Geobot (2015) 50: 239.
- Bruneton J., 1999. Pharmacognosie-Phytochimie-Plantes médicinales. Technique et documentation. Lavoisier 3ème édition 17(5): 54-61
- Bruneton J., 2009. Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales. 4e éd. revue et augmentée, Paris, Tec & Doc - Éditions médicales internationales, 1288 p.
- Chaieb, M. 1989. Influence des réserves hydriques du sol sur le comportement comparé de quelques espèces végétales de la zone aride tunisienne. Thèse de Doctorat, Université des Sciences et Techniques, Montpellier :292p.
- Chaieb, M. Floret, C. Le Floc'h, E. Pontanier, R. 1992. Life history strategies and water resource allocation in five pasture species of the Tunisian arid zone. *Arid Soil Research and Rehabilitation*, 6 :1-10.
- Chaieb, M. 1993. Réponse écophysiological de trois graminées pérennes soumises à des conditions écologiques contrastées en milieu aride de Tunisie. Thèse de Doctorat ès Sciences Naturelles, Univ. Sfax. 238 p.
- Chaieb, M. Boukhris, M. 1998. Flore succincte et illustrée des zones arides et sahariennes de Tunisie. Sfax, Tunisie: Association pour la Protection de la Nature et de l'Environnement. L'Or du temps. 290 pp.
- Chaudhri M., Paronychia C., Murbeck S., 1988. *Paronychia chlorothyrsa*

- (Caryophyllaceae) in the Iberian Peninsula. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*; 45(1), 361-372.
- Corea, G. Fattorusso, E. Lanzotti, V. Tagliata-Scafati, O. Appendino, G. Ballero, M. Simon, P.N. Dumontet, C. Di Pietro, A. 2003. Jatropane diterpenes as glycoprotein inhibitors. First insights of structure–activity relationships and discovery of a new powerful lead. *J. Med. Chem.* 46, 3395–3402.
- Cottiglia F., Loy G., Garau D., Fions C., Caus M., Pompei R., Bonsignore L., 2008. Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L. *Phytomedicine*; 8, 302-305.
- Cuenod, A. Pottier-Alapetite, G. et Labbe, A. 1954. *Flore analytique et synoptique de la Tunisie. Cryptogames vasculaires, Gymnospermes et Monocotylédones*. Office de l'expérimentation et de la vulgarisation agricole de Tunisie. 287 p. Tunis.
- Dawidar, A. M. Reisch, J. Amer, M. A. 1981. Structure of cornulacic and monacanthic acids, two new triterpenes from *Cornula camonacantha* Del. *Egyptian Journal of Chemistry*, 23(1), 31-8.
- Derbel, S. Bouaziz, M. Dhoub, A. Sayadi, S. Chaieb, M. 2010. Chemical composition and biological potential of seed oil and leaf extracts of *Henophyton deserti* Coss. & Durieu. *Comptes Rendus Chimie*, 13(4):473-480.
- Derbel, S. Touzard, B. Triki, M.A and Chaieb, M. 2010. Seed germination responses of the Saharan plant species *Ephedra alata* ssp. *alenda* to fungicide seed treatments in the laboratory and the field. *Flora, Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*. V. 205. No 7. P. 471-474.
- Derbel, S. 2012. Statut écologique et stratégies adaptatives et fonctionnelles de certaines espèces végétales sahariennes Nord-africaines. Thèse de Doctorat, soutenue à l'Université de Sfax (Tunisie), 187p.
- Djebbari, R. Chemam, Y. Amrani, A. Lassed, S. Boubekri, N. Zama, D. Fadila Ben ayache, F. & Ben ayache, S. 2015. In vitro antioxidant activities of n-butanol extract of *Helianthemum confertum*. *International Journal of Phytomedicine* 7:119-122.
- Dobignard, A. Chatelain, C. 2010. Index synonymique. Flore d'Afrique du Nord. vol. 1,

Genève, 455 p.

- Dohou N., Yamni K., Tahrouch S., Hassani L.M., BADOUC A., Gmira N., 2003. Screening phytochimique d'une endémique ibér marocaine, *thymelaea lthyroides*. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux; 142, 61-78.
- El Hilali, J. Hmammouchi and M. Lyoussi, B. 2003. Ethno botanical studies and economic evaluation of medicinal plants in Taounate province (Northern Morocco). *Journal of Ethnopharmacology*; V. 86. P. 149-158.
- El-Bassuony, Ashraf, A. 2007. Antibacterial activity of new polyester diterpenes from *Euphorbia guyoniana*. *Asian Journal of Chemistry*, 19, 4553-4562.
- El Shazly A., Ateya A., Abdel .Ali M., El dahmy S., Tel A., Wink M.,(1999). pyrrolizidine alkaloids from *Echium rauwolfu* and *Echium horridum*(Borraginaceae). *Z. Naturforschung*; 54:295 -300.
- Fai, P.B.A and Fagade, S. 2005. Acute toxicity of *Euphorbia kamerunica* on *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. V. 62. No 1. P. 128-131.
- Floret, C. Pontanier, R. 1982. L'aridité en Tunisie présharienne. In *Travaux et Documents de l'Orstom*, O.R.S.T.O.M. : 19-50; (b) Le Houérou HN. (1996) Climate change drought & desertification. *J. Arid Environ.* 34, 133-185.
- Ghada, A.H and Taghried, M. 2011. Callus Induction and Extraction of Ephedrine from *Ephedra alata* Decne. Cultures. *American – Eurasian Journal Agric. & Environ.* V. 11. No 1. P. 19-25.
- Ghanem, S and El-Magly, U.I.A. 2008. Antimicrobial Activity and Tentative Identification of Active Compounds from the Medicinal *Ephedra alata* Male Plant "Arabic abstracts" - *Journal of Taibah University Medical Sciences*. V. 3 No 1. P. 7-15.
- Ghasemi, M. Azarnia, M. Jamali, M. Mirabolghasemi, G. Nazarian, S. Naghizadeh, M.M. Rajabi, M and Tahamtani, Y. 2014. Protective effects of *Ephedra pachyclada* extract on mouse models of carbon tetrachloride-induced chronic and acute liver failure. *Tissue and Cell*. V. 46. No 1. P. 78-85.

- Godevac, D. Zdunic, G. Savikin, K. Vajs, V. Menkovic, N. 2008. Antioxidant activity of nine Fabaceae species growing in Serbia and Montenegro. *Fitoterapia*, 79, 185-187.
- Gounot, M. & Le Houérou, H.N. 1988. Carte bioclimatique de la Tunisie (1 feuille 1/2 000 000, 1959). Montpellier : CEPE (réédition couleur 1/1 000 000).
- Greuter, W. Burdet, H. M. & Long, G. 1984, 1986, 1989: Med-Checklist 1, 3, 4. – Genève & Berlin.
- Guasch, L. Sala, E. Ojeda, M. J. Valls, C. Blade, C. Mulero, M. Blay, M. Ardevol, A. Garcia-Vallve, S. Pujadas, G. 2012. Identification of novel human dipeptidyl peptidase-IV inhibitors of natural origin (Part II): in silico prediction in anti diabetic extracts. *PLoS One*. 7(9), e44972. DOI:10.1371/journal.pone.0044972.
- Haba, H. Lavaud, C. Harkat, H. Magid, A.A. Marcourt, L and Benkhaled, M. 2007. Diterpenoids and triterpenoids from *Euphorbia guyoniana*. *Phytochemistry*. V. 68. No 9. P. 1255 – 1260.
- Haba, H. Lavaud, C. Marcourt, L. Long, C. Harkat, H. Benkhaled, M. 2009. Entabietanediterpenoids from *Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37, 504-508; (b).
- Hammouda F.M., Ismail S.I., Abdel-Azim N.S., Shams K.A., (2005). *Cifrullus colocyntis* L. A Guide to Medicinal Plants in North Africa; 87-89.
- Harborne J.B., 1998 . *Phytochemical method. A guide to modern techniques of plants analysis*. Third Edition. ISBN: 0-412-57260-5 (HB) and (PB).
- Hegazy, M.E.F. Mohamed, A.H. Aoki, N. Ikeuchi, T. Ohta, E. Ohta, S. 2010. Bioactive jatrophane diterpenes from *Euphorbia guyoniana*. *Phytochemistry*, 71, 249-253.
- Herbert R.B., 1989. *The biosynthesis of secondary metabolites*. 2<sup>nd</sup> edition Chapman and Halle; 11-115.
- Hohmann, J. Ferenc. Evanics, F. Dombi, G and Szabó, P. 2001. Salicifoline and salicinolide, new diterpene polyesters from *Euphorbia salicifolia*. *Tetrahedron Letters*. V. 42. No 37. P. 6581-6584. Available from.

- Holmberg B. ; Högberg J. ; Johanson G. (2000). La Toxicologie. Définitions et Concepts. In *Encyclopédie de Sécurité et de Santé au Travail*. Vol 1 (edited by J. M. Stellman), pp 33.3-33.8. Organisation Internationale du Travail, Genève.
- Ibrahim, M.M. 2012. Instinctive Plant Tolerance towards Abiotic Stresses in Arid Regions. In *Artificial Photosynthesis*. Vol.6, Najafpour, M. (Ed). In Tech : 219-233.
- Jain S.C., Sharma R., Jain R., Sharma R.A., 1996 . Antimicrobial activity of *Calotropis procera*. *Fitoterapia*; 67(3): 275-277.
- Jassbi, A. 2006. Chemistry and biological activity of secondary metabolites in Euphorbia. *Phytochemistry* 67, 1977–1984.
- Jeppesen, A.S. Soelberg, J. Jager, A.K. 2012. Antibacterial and COX-1 inhibitory effect of medicinal plants from the Pamir Mountains, Afghanistan. *Plants*, 1, 74-81.
- Judzentiene, A. Budiene, J. Gircyte, R. Masotti, V and Laffont-Schwob, I. 2012. Toxic Activity and Chemical Composition of Lithuanian Wormwood (*Artemisia absinthium L.*) Essential Oils. *Records of Natural Products*. V. 6. No 2. P. 180.
- Kabera J. N., Kakana P., Bigendako M., Tomani J.C., (2000). Centre de Recherche en Phytomédicaments et Sciences de la Vie de l'IRST A la recherche des composés bioactifs à base de plantes : cas du RWANDJA .*Lebanese Science Journal*, Vol.14, No.2.
- Kadri, A. Chobba, I. Zarai, Z. et al. 2011. Chemical constituents and antioxidant activity of the essential oil from aerial parts of *Artemisia herba-alba* grown in Tunisian semi-arid region. *African Journal of Biotechnology*, 10 : 2923–2929.
- Kamel, M.S. Othani, K. Hassanean, H.A. Khalifa, A.A. Kasai, R. Yamaskaki, K.K. 2000. Triterpenoidal saponins from *Cornula camonacantha*. *Pharmazie* Vol. 55. pp. 460-462.
- Kandil, F.E. Hussein, H.A. 1998. A new flavonoid from *Cornulacamomacantha*. *Oriental J. Chem.* 215 p.
- Kandil, F.E. Grace, M.H. 2001. Polyphenols from *Cornula camonacantha*. *Phytochemistry*, vol 58. pp. 611-613.

- Kaoubaia G., Ayachb N., Elhafidb N., Bennanib S., Elkhayatb G., Medkourib M., Zamdb K., Hachimb M., Benghanemb B., Ramdanib G., 2011. Toxicité rénale secondaire à la prise de m'khinza. *Néphrologie & Thérapeutique* 7 ; 411-447.
- Khadem, S. and Marles, R.J. 2010. Monocyclic Phenolic Acids; Hydroxy- and Polyhydroxy benzoic Acids: Occurrence and Recent Bioactivity Studies. *Molecules*, 15 : 7985-8005.
- Khattabi A., Rhalem N., Chabat A., Skali S, Soulaymani-Bencheich R., 2010. Plantes toxiques : définition et classification. *Toxicologie Maroc*; 2: 3-4.
- Khatteli, H. 1996. L'érosion éolienne en Tunisie aride et désertique : analyse des processus et recherche des moyens de lutte, Thèse de doctorat Ph. D.
- Kúsz, N. Orvos, P. Csorba, A. Tálosi, L. Chaieb, M. Hohmann, H. & Rédei, D. Jatropane diterpenes from *Euphorbia guyoniana* are new potent inhibitors of atrial GIRK channels. Submitted to *Phytochemistry*.
- Lapointe, G. 2004. *Notions de Toxicologie*. Commission de la Santé et de la Sécurité du Travail du Québec, Québec. 67 p.
- Le Floc'h, E. 1983. Contribution à une étude ethnobotanique de la flore tunisienne. (edn) Imprimerie officielle de la République tunisienne. Tunis.
- Le Floc'h, E. & Boulos, L. 2008. Flore de Tunisie – Catalogue synonymique commenté. Montpellier. 461 pp.
- Le Houérou, H.N. 1959. Recherches écologiques et Floristiques sur la Végétation de la Tunisie méridionale. *Inst. Rech. Sahariennes, Alger*, 2Vol ; 503p.
- Le Houérou, H.N. 1969. La végétation de la Tunisie steppique. *Ann. Inst. Nat. Rech. Agron. Tunisie*, 42: 1- 646.
- Le Houérou, H.N. & Ionesco, T. 1973. *Palatabilité des espèces végétales de la Tunisie steppique (indices spécifiques)*. Projet FAO/TUN-71/525. Rome : FAO, Division Prod. Et Protect. Plantes.
- Le Houérou, H.N. 1990. Recherches écoclimatiques et biogéographiques sur les zones arides (s.l.) de l'Afrique du Nord. Thèse de Doctorat d'État, Université Paul Valéry, Montpellier, 2 tomes (184 p. et 189 p.) + annexes (182 p.).

- Le Houérou, H.N. 2000. Utilization of fodder trees and shrubs in the arid and semi-arid zones of West Asia and North Africa. *Arid Soil Res. Rehab.*, 14: 101-135.
- Li W. C., Zhou J., Guo S. Y. and Guo L. D., 2007. Endophytic fungi associated with lichens in Baihua mountain of Beijing, China. *Fungal Diversity*; 25: 69-80.
- Lima, E.M.C. Medeiros, J.M.R. Davin, L.B. 2003. Pentacyclitriterpenes from *Euphorbia stygiana*. *Phytochemistry* 63, 421–425.
- Mandaville, J.P. 1990. Flora of Eastern Saudi Arabia. Kegan Paul International London and New York Jointly with the National Commission for Wildlife Conservation and Development. Riyadh, Saudi Arabia, p. 482.
- Mann, C.M. Markham, J.L. 1998. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 538-544.
- Meddour A., Yahial M., Benkiki, N Ayachi A., 2013. Etude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du *capparis spinosa* L. *Lebanese Science Journal* ; Vol. 14, No. 1, 49.
- Mekkiou, R. Touahar, H. Dijoux-franca, M.G. Mariotte, A.M. Ben ayache, S and Ben ayache, F. 2005. A new isoflavone from *Genista saharae* (Fabaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. V. 33 No 6. P. 635 – 638.
- Mohammedi zohra., 2013. Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie. Thèse de doctorat;
- Molnár, J. Ocsovszki, I. Puskás, L. Ghane T, Hohmann. J. Zupkó, I. 2013. Investigation of the antiproliferative action of the quinoline alkaloid skokusa ginine and skimmianine on human cellines. *Current Signal Transduction Therapy*, 8, 148-155.
- Monod, T. 1992. Du désert. *Sécheresse*, 3: 7-24.
- Monroy, A.A. 1989. Installation de plantes pérennes de la zone aride soumises à des contraintes hydriques contrôlées et à des coupes - Thèse de Doctorat en Physiologie et biologie des organismes et populations - Soutenue en 1989

à Montpellier 2.

- Moraga, A.R. Aragandona, J. Mota, B. Perez, J. Verde, A. Fajardo, J. Gomez-Navarro, J. Castillo-Lopez, R. Ahrazem, O and Gomez-Gomez, L. 2013. Screening for polyphenols, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from eleven *Helianthemum taxa* (Cistaceae) used in folk medicine in south-eastern Spain. *Journal of Ethnopharmacology*. V. 148 No 1. P. 287-296.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cyto-toxicity assays. *Journal of Immunology Methods*, 65, 55–63.
- Mraicha, F. Ksantini, M. Zouch, O. Ayadi, M. Sayadi, S. and Bouaziz, M. 2010 . Effect of olive fruit fly infestation on the quality of olive oil from Chemlali cultivar during ripening. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 3235–3241.
- Murray EJ, Burden F, Horscroft N, Smith-Burchnell C, Westby M. Knockdown of USP18 Increases Alpha 2a Interferon Signaling and Induction of Interferon-Stimulating Genes but Does Not Increase Antiviral Activity in Huh7 Cells ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Sept. 2011, p. 4311–4319.
- Nafisi S., Bonsaii M., Maali P., Khalilzadeh MA., Manouchehri F., 2010. Beta-carboline alkaloids bind DNA. *Journal of Photochemistry and Photobiology*: 100: 84-91.
- Nawwar, Mahmoud, A.M. El-Sissi, Hassan, I. Barakat, Heba, H. 1984. Flavonoid constituents of *Ephedra alata*. *Phytochemistry*, 23(12), 2937-9. DOI:10.1016/0031-922(84)8045-9.
- Nawwar, M.A, El-Sissi , H. Barakat, H.H. 1984. Flavonoid constituents of *Ephedra alata*. *Phytochemistry*, 23, 2937-2939.
- Nawwar, M.A. Barakat, H.H. Buddrus, J. Linscheid, M. 1985. Alkaloidal, lignan and phenolic constituents of *Ephedra alata*. *Phytochemistry*, 24, 878-879; (b)
- Negre, R. 1961 & 1962 - Petite flore des régions arides du Maroc occidental. C.N.R.S. 979 p. Paris.
- Oksuz, S. Ulubelen, A. Barla, A. Voelter, W. 2002. Terpenoids and aromatic compounds

from *Euphorbia heteradena*. Turk. J. Chem. 26, 457–463.

- OMS, 2006. Le cancer. Aide-mémoire. W. H. Organisation, World Health Organisation. 297 : 1-4.
- Ourcival, J.M. Floret, C. Le Floch, E and Pontanier, R. 1994. Water relation between two perennial species in the steppes of southern Tunisia. *Journal of Arid Environments*. V. 28. No 4. P. 333-350.
- Ozenda, P. 1983. *Flore du Sahara*, 2<sup>e</sup> éd. du CNRS, Paris, 624 p.
- Ozenda, P. 1991. Flore et Végétation du Sahara. CNRS, Paris, pp. 329–331.
- Ozenda, P. 2004. Flore et végétation du Sahara. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris. 621 p.
- Palici, F.I. Liktor-Busa, E. Zupkó, I. Touzard, B. Chaieb, M. Hohmann, J. 2015. Study of in vitro antimicrobial and antiproliferative activities of selected saharan plants. *Acta Biologica Hungarica* .vol. 66 N°. 4, P. 385-394.
- Palici, I.F. Liktor-Busa, E. Zupkó, I. Touzard, B. Chaieb, M. Urbán, E. Hohmann, J. 2015. Antimicrobial and antiproliferative activities of some North African desert plants. International Congress and Annual Meeting of the Society-for-Medicinal-Plant-and-Natural-Product-Research (GA Budapest, HUN (2015-08-23 - 27).
- Papaefthimiou, D. Papanikolaou, A. Givanoudi, S. Kanellis, A.K. Falara, V. Kostas, S. 2014. Genus *Cistus*: a model for exploring glabdane-type diterpenes' biosynthesis and a natural source of high value products with biological, aromatic, and pharmacological properties. *Frontiers in Chemistry*, 2, 35.
- Parsaeimehr, A. Sargsyan, E and Javidnia, K. 2010. A comparative study of the antibacterial, antifungal and antioxidant activity and total content of phenolic compounds of cell cultures and wild plants of three endemic species of *Ephedra*. *Molecules*. V. 15. No 3. P. 1668-1678.
- Peronnet, M. Chatin, J. 1942. The North African drug *Ephedra alata* var. *alenda*. *Journal de Pharmacie et de Chimie*, 2, 19-28.
- Pottier-Alapetite, G. 1979-1981: Flore de la Tunisie. Angiospermes Dicotylédones : apétales dialypétales - gamopétales. Première et deuxième partie. - Ouvrage publié

par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique et le Ministère de l'Agriculture - Tunisie, 1190 p.

- Quezel, P. Santa, S. 1963. In: Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, vols. 1–2. CNRS, Paris, pp. 600–601.
- Quezel, P. 1978: Analysis of the Flora of Mediterranean and Saharan Africa. - *Annals of the Missouri Botanic Garden* 65: 479-534. & Santa, S. 1962-1963: Nouvelle flore de l'Algérie et des Régions désertiques méridionales. Tome et II. - Centre National de la Recherche Scientifique. France, Paris 7, 1170 p.
- Rastogi, T., Hildesheim, A., Sinha, R., 2004. « Opportunities for cancer epidemiology in developing countries. » *Nat Rev Cancer* 4(11) : 909-917.
- Ratnam, D.V. Ankola, D.D. Bhardwaj, V. Sahana, D.K. and Kumar, M. N. V. R. 2006. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, 113 (3): 189–207.
- Rédei, D. Hohmann, J. Evanics, F. Forgo, P. Szabo, P. Mathe, I. 2003. Isolation and structural characterization of new, highly functionalized diterpenes from *Euphorbia serrulata*. *Helv. Chim. Acta* 86, 280–289.
- Rédei, D. Forgo, P. Molnár, J. Szabó, P. Zorig, T and Hohmann, J. 2012. Jatrophone diterpenoids with multidrug resistance-modulating activity from *Euphorbia mongolica* *Prokh. Tetrahedron*. V. 68. No 40. P. 8403-8407.
- Rizk, A.M. Heiba, H.I Ma'Ayergi, H.A Batanouny, K.H. 1986. Constituents of plants growing in Qatar. *Fitoterapia*, 57, 3-9.
- Rizk, A.M. Hammouda, F.M. Ismail, S.I. Hassan, N.M. Hosseiny, H.A. Roeder, E. Wiedenfeld, H. Ghaleb, H.A. Madkour, M.K. 1988. Constituents of plants growing in Qatar. Part XV. Chemical investigation and pharmacotoxicity of pyrrolizidine alkaloids of *Moltikio psisciliata*. *International Journal of Crude Drug Research*, 26, 112-116.
- Rubio-Moraga, A. Argandona, J. Mota, B. Perez, J. Verde, A. Fajardo, J. Gomez-Navarro, J. Castillo-Lopez, R. Ahrazem, O. Gomez-Gomez, L. 2013. Screening for polyphenols, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from eleven *Helianthemum* taxa (Cistaceae) used in folk medicine in south-eastern Spain.

- Sahoo K P, Kasera K Pawan, Sher Mohammed. Secondary metabolites produced during different seasons in some arid medicinal plants. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 2012, 2 (6):650-652
- Schiffers, H. 1971. Das Wasser in der Sahara. In *Die Sahara und ihre Randgebiete : Darstellungen eines Naturgrobraumes*; edited by Schiffers, H. (München : Weltforum-Verlag), pp.405-428.
- Scognamiglio, M. D'Abrosca, B. Pacifico, S. et al. 2012. Polyphenol characterization and antioxidant evaluation of *Olea europaea* varieties cultivated in Cilento National Park (Italy). *Food Research International*, 46 : 294–303.
- Selmi, A. & Ferchichi, A. Evaluation of mineral composition of *Anthyllis sericea* for grazing ruminants in Tunisia. *Mintage Journal of Pharmaceutical & Medical Sciences*, 4 : 36-38.
- Shabana, M.M. Mirhom, Y.W. Genenah, A.A. Aboutabl, E. A. Amer, H. A. 1990. Study into wild Egyptian plants of potential medicinal activity. Ninth communication: hypoglycaemic activity of some selected plants in normal fasting and alloxanised rats. *Archiv für experimentelle Veterinarmedizin*, 44(3), 389-94.
- Shaker KH, Al Shehri BM, Oteef MDY, Mahmoud FM. Antioxidant Compounds from *Euphorbia schimperiana* Scheele in Aseer Region, Saudi Arabia. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 32(1), May June 2015; Article No. 21, Pages : 117-122.
- Shi, H.M. Williams, I.D. Sung, H.H.Y. Zhu, H.X. Ip, N.Y. Min, Z.D. 2005. Cytotoxic diterpenoids from the roots of *Euphorbia ebracteolata*. *Planta Med.* 71, 349–354.
- Singh A, Sarkar A, Singh S. Agrawal S.B. Investigation of supplemental ultraviolet-B-induced changes in antioxidative defense system and leaf proteome in radish (*Raphanus sativus* L. cv Truthful): an insight to plant response under high oxidative stress. *Protoplasma*. 2010 Sep;245(1-4):75-83 Epub 2010 Apr 18.
- Singla, A. Pathak, K. 1990. Phytoconstituents of *Euphorbia* species. *Fitoterapia* 61, 483–

- Soltan, M.M. Zaki, A. Kamal. 2009. Antiviral screening of forty-two Egyptian medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*, 126(1), 102-7.
- Stocker, P. Yousfi, M. Salmi, C. Perrier, J. Brunel, J.M.A. 2005. *Biochimie* 87,507.
- Sulyok, E. Vasas, A. Redei, D. Dombi, G and Hohmann, J. 2009. Isolation and structure determination of new 4,12-dideoxyphorbol esters from *Euphorbia pannonica* Host. *Tetrahedron*. V. 65. No 20. P. 4013-4016.
- Tackholm, V. 1974. *Students Flora of Egypt*. Cairo Univ. Press, Cairo. p. 888.
- Tanaka, R., Kasubuchi, K., Kita, S., Matsunaga, S. 1999. Obtusifoliol and related steroids from the whole herb of *Euphorbia chamaesyce*. *Phytochemistry* 51, 457–463.
- Tao, W.W. Duan, J.A. Tang, Y.P. Yang, N.Y. Li, J.P and Qian, Y.F. 2013. Casbanediterpenoids from the roots of *Euphorbia pekinensis*. *Phytochemistry*. V. 94 P. 249-253.
- Tiwari, S and Singh, A. 2004. Piscicidal and anti-acetylcholinesterase activity of *Euphorbia royleana* stem bark extracts against freshwater common predatory fish *Channapunctatus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. V. 8. No 1. P. 47-53.
- Tron I., Piquet O., Baert A., Mouton C., (2002). *Toxon Manuel de Toxicologie. Guide technique*. ADEME, Angers; 128p.
- Tusevski, O. Kostovska, A. Iloska, A. Trajkovska, L. Simic, S.G. 2014. Phenolic production and antioxidant properties of some Macedonian medicinal plants. *Central European Journal of Biology*, 9, 888-990.
- Vasas, A. Sulyok, E. Martins, A. Redei, D. Forgo, P. Kele, Z. Zupkó, I. Molnár, J. Pinke, G and Hohmann, J. 2012. Cyclomyrsinane and premyrsinane diterpenes from *Euphorbia falcata* modulate resistance of cancer cells to doxorubicin. *Tetrahedron*. V. 68. No 4. P. 1280-1285.

- Veiga Junior V.F., Pinto AC., (2005). «Plantas medicinais: cura segura? » Quimica Nova; vol. 28, p :519-528.
- Viala A., Botta A., (2007). Toxicologie, 2ème édition, Lavoisier; pp 03-10. 68. Wang W.J., Yi M.G., Zhu X.Y., 1988. A study on absorption, distribution and excretion of tritiated shikonin in mice. Acta Pharm. Sin. ; 23:246-251.
- Wafaa, A.A. Abdulaziz, A.A. Moodi, S.A. 2010. Effect of water stress by Polyethylene Glycol 8000 and Sodium Chloride on germination of Ephedra alata Decne. seeds. doi:10.1016/j.sjbs.2010.04.011.
- Webster, G. 1994. Systematic of the Euphorbiaceae: introduction. Ann. Miss. Bot. Gard. 81, 33–144.
- Xie J, Schaich KM, Re-evaluation of the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Free Radical DPPH Assay for Antioxidant Activity Journal of Agricultural and Food Chemistry (2014) 62(19).
- Yen, M.H. Lee, J.J. Yeh, C.F. Wang, K.C. Chiang, T.W. Chiang, L.C and Chang, J.S. 2014. Yakammao to inhibited human coxsackievirus B4 (CVB4)-induced airway and renal tubular injuries by preventing viral attachment, internalization, and replication. *Journal of Ethnopharmacology*. V. 51 No 3. P. 1056-1063.
- Younos C., Soulimani R., Seddiqi N., Baburi O., Dicko A., 2005. Etude Ethnobotanique et historique des tamaris (*Tamarix sp.*, tamaricaceae) et leurs usages actuels en Afghanistan. *Phytothérapie* ; 6, 248-251.
- Zaafouri, M.S. 1993. Contraintes du milieu et réponses de quelques espèces arbustives exotiques introduites en Tunisie présaharienne. Thèse de Doctorat, présentée à l'Université de St Jérôme ; Aix-Marseille.
- Zeghad F, Djilani SE, Djilani A, Dicko A. Antimicrobial and antioxidant activities of three Euphorbia species Turk J Pharm Sci. 2016; 13(1): 22-37.

