

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Abderrahmane Mira de Bejaïa  
Faculté des sciences de la nature et de la vie  
Département de Biologie Physico-chimique

## Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention du diplôme de Master  
En Biochimie Appliquée

### Thème

*Caractérisation de l'activité antioxydante  
des extraits des feuilles et des racines de  
Thapsia garganica L.*

#### Présenté par :

M<sup>elle</sup>: Cheurfa Lynda

M<sup>elle</sup>: Bachagha Hamida

#### Membres du Jury:

Présidente : M<sup>me</sup> Bedjou F.

Promotrice : M<sup>elle</sup> Adrar S.

Examinatrices: M<sup>elle</sup> Zemouri S.

M<sup>me</sup> Hamitouche L.

#### Grade et lieu

M.C.A (UAMB)

M.A.B (UAMB)

M.A.B (UAMB)

M.A.B (UAMB)

2012-2013



# Remerciements

*Louange à ALLAH, le miséricordieux qui nous a donné patience et courage afin d'achever ce travail.*

*Nous remercions tous particulièrement notre promotrice, M<sup>elle</sup> Adrar Sabah. Pour l'honneur qu'elle nous a fait en nous encadrant, pour l'aide précieuse qu'elle nous a apporté, pour ses remarques et ses conseils avisés, qui nous ont permis de mener à bien ce travail.*

*Nous tenons à remercier aussi M<sup>me</sup> Bedjou F. d'avoir accepté de présider ce jury et d'apporter ses appréciations sur notre travail.*

*Merci à M<sup>me</sup> Abderrahim S. et M<sup>me</sup> Bejou F. pour nous avoir accueillie au sein de leurs laboratoire.*

*Nous remercions également M<sup>elle</sup> Zemouri S. et M<sup>me</sup> Hamitouche L. qui nous ont fait l'honneur de juger ce travail.*

*A toute personne ayant participé de pré ou de loin à notre formation et à tous Ceux qui nous ont apporté leurs soutiens et encouragements durant la réalisation de ce travail.*

*Linda Ch. et Hamida B.*







## Dédicaces

*Avec ma gratitude et tout mon amour, je dédie ce travail :*

*Aux deux être les plus chers au monde qui ont donné sens à mon existence, en m'offrant une éducation digne de confiance qui m'ont soutenu nuit et jours durant tout mon parcours.*

*J'espère que par ce modeste travail, je vous rends un peu de ce sentiment de fierté que j'éprouve d'être votre fille*

*A mon cher mari Djahid et sa famille*

*Ma très chère sœur Siham, son mari et ma très chère nièce Zakou.*

*Mes très chers frères, Tarik, Said et Aythem*

*A mon oncle Djamal, sa femme et leurs enfants*

*A toute la famille Cheurfa*

*A ma grand-mère Louiza*

*A toutes mes amies : Djidji, Linda, Samira, Farida, Zina, Salwa, Rosalya, Sarah, Souhila, et à mes coupines de chambre.*

*A ma chère binôme Hamida et sa famille*

*A toute la promotion de biochimie appliquée « 2013 ».*

*Linda Ch.*





## Dédicaces

*Avec ma gratitude et tout mon amour, je dédie ce travail :*

*Aux deux être les plus chers au monde qui ont donné sens à mon existence, en m'offrant une éducation digne de confiance qui m'ont soutenu nuit et jours durant tout mon parcours.*

*J'espère que par ce modeste travail, je vous rends un peu de ce sentiment de fierté que j'éprouve d'être votre fille*

*Mes très chères sœurs Nabila, Souad, Hassina, Nadia, Kïno ainsi que mes adorables nièces Anais, Rodyna, et mon neveu Rached Mouhamed*

*Mon très cher frère, Smail,*

*A toute la famille Bachagha*

*A la mémoire de mes grands parents Amer et Ali et dada hacen que dieu les bénisse dans son vaste paradis*

*Et a mes grand mères Wridha et Baya*

*A toutes mes amies : Nouria, lamia, Hassiba, Linda, Djidji, Afaf, Djazia et Kahina, Narimane, Yasmina, Sahra. Sabrina, Soraya, Samira,*

*Amel, Lola, Rahima. Rachid, Karim, Rida, Rafik,*

*A ma chère binôme Linda et sa famille*

*A toute la promotion de biochimie appliquée « 2013 ».*

*Hamida.B*



## *Liste des abréviations*

- ABTS** : acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline)-6-sulfonique
- ADN**: Acide désoxyribonucléique
- AOX**: Antioxydant
- BHA**: Butylated hydroxyanisole
- Ca<sup>2+</sup>** : Calcium ionique
- CCM** : Chromatographie Couche sur Mince
- DPPH**: 1,1- Diphenyl- 2- Picryl- Hydrazyl
- ERN**: Espèce Réactive de Nitrogène
- ERO**: Espèce Réactive de l'Oxygène
- Fe<sup>2+</sup>** : Fer ferreux
- Fe<sup>3+</sup>** : Fer ferrique
- FeCl<sub>3</sub>** : Chlorure ferrique
- GC-MS**: chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.
- GPx**: Glutathion Peroxyde.
- GSH**: Glutathion.
- H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>** : Acide phosphomolybdique
- H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>** : Acide phosphotungstique.
- HPLC**: chromatographie en phase liquide à haute performance.
- IC<sub>50</sub>** : Concentration inhibitrice à 50%
- NADP**: Nicotinamide Adenine Dinucléotide Phosphate.
- NADPH**: Nicotinamide Adenine Dinucléotide Phosphate Hydrogenase.
- NOS**: Nitric Oxide Synthases.
- RL**: Radical Libre.
- RMN**: Résonance magnétique nucléaire.
- SERCA**: Sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase.
- SOD**: Superoxyde-dismutase.
- TCA**: Acide TrichloroAcétique
- XO**: Xanthine Oxydase.

## *Liste des figures*

<b>Figure 1:</b> Photographies des racines et des parties aériennes de <i>Thapsia garganica</i> L.....	5
<b>Figure 2:</b> Structure phénylpropanoïde isolé à partir de <i>Thapsia garganica</i> L.....	6
<b>Figure 3:</b> Structure de la thapsigargines et de la thapsigargicine.....	7
<b>Figure 4:</b> Sources cellulaires et interconversions des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN) .....	11
<b>Figure 5:</b> Conséquences du stress oxydatif.....	15
<b>Figure 6:</b> Les trois étapes de la peroxydation lipidique.....	15
<b>Figure 7:</b> Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules .....	16
<b>Figure 8:</b> Destruction du cartilage par l'OONO-.....	17
<b>Figure 9:</b> Sources métaboliques de production et d'élimination des radicaux libres.....	18
<b>Figure 10:</b> Structure chimique de La vitamine E .....	20
<b>Figure 11:</b> Réaction entre l'acide ascorbique et un radicale (R').....	20
<b>Figure 12:</b> Structure des caroténoïdes .....	21
<b>Figure 13:</b> Structure chimique des acides phénoliques .....	24
<b>Figure 14:</b> Structures chimiques des dérivés de coumarines .....	24
<b>Figure 15 :</b> Structure d'un tanin hydrolysable .....	25
<b>Figure 16:</b> Structure de base d'un tanin condensé .....	25
<b>Figure 17:</b> Structure de base des flavonoïdes .....	26
<b>Figure 18:</b> Structures chimiques des flavonoïdes .....	26
<b>Figure 19:</b> Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques.....	27
<b>Figure 20:</b> Piégeage des ERO par les flavonoïdes.....	28
<b>Figure 21:</b> Photographies des feuilles et des racines de <i>Thapsia garganica</i> L.....	30
<b>Figure 22:</b> protocole d'extraction des composés phénoliques totaux .....	31
<b>Figure 23:</b> Protocole de dosage des composés phénoliques.....	32
<b>Figure 24:</b> protocole de dosage des flavonoïdes .....	33



<b>Figure 25:</b> Mécanisme de la réaction de la vanilline avec les tanins condensés.....	34
<b>Figure 26:</b> protocole de dosage des proanthocyanidines.....	34
<b>Figure 27:</b> Formes oxydé et réduite du radical stable DPPH.....	35
<b>Figure 28:</b> Protocole de l'activité antiradicalaire des extraits de <i>Thapsia garganica</i> L.....	36
<b>Figure 29:</b> Protocole de l'évaluation de l'activité anti-radicalaire des extraits par l'ABTS....	37
<b>Figure 30:</b> Protocole de l'évaluation du pouvoir réducteur des extraits de <i>Thapsia garganica</i> L .....	38
<b>Figure 31:</b> Représentation graphique des teneurs en phénols totaux des extraits des feuilles et des racines de <i>Thapsia garganica</i> L.....	42
<b>Figure 32:</b> Teneurs en flavonoïdes des extraits de racines et de feuilles de <i>Thapsia garganica</i> L.....	44
<b>Figure 33:</b> Représentation graphique des quantités en proanthocyanidines dans les différents extraits des feuilles et des racines de <i>Thapsia garganica</i> L.....	46
<b>Figure 34:</b> Activité scavenging du radical DPPH par les extraits de <i>Thapsia garganica</i> L.....	47
<b>Figure 35:</b> Activité scavenging du radical DPPH à différentes concentrations de l'extrait aqueux du chloroforme des feuilles de <i>Thapsia garganica</i> L.....	49
<b>Figure 36:</b> Activité scavenging de radical DPPH des différentes concentrations de l'acide ascorbique et de la BHA.....	49
<b>Figure 37:</b> Activité inhibitrice du radical ABTS <sup>•+</sup> par les extraits de <i>Thapsia garganica</i> L...50	50
<b>Figure 38:</b> Activité scavenging du radical ABTS par l'antioxydant de synthèse (Trolox).....	51
<b>Figure 39:</b> Activité scavenging du radical ABTS à différentes concentrations des extraits des feuilles.....	52
<b>Figure 40:</b> Activité scavenging du radical ABTS à différentes concentrations des l'extraits des racines .....	52
<b>Figure 41:</b> pouvoir réducteur de l'antioxydant de synthèse la BHA .....	53
<b>Figure 42:</b> pouvoir réducteur des extraits des feuilles et des racines de <i>Thapsia garganica</i> L.....	54
<b>Figure 43:</b> profil chromatographique de tous les extraits des feuilles et des racines de <i>Thapsia garganica</i> L.....	56

<b>Figure 44:</b> profil chromatographique de tous les extraits de feuilles et de racines de <i>Thapsia garganica L.</i> .....	57
<b>Figure 45:</b> profil chromatographique de tous les extraits de feuilles et de racines de <i>Thapsia garganica L.</i> observer sous UV.....	58
<b>Figure 46:</b> profil chromatographique des extraits de <i>Thapsia garganica L.</i> pulvérisée avec le DPPH.....	60
<b>Figure 48:</b> profil chromatographique des extraits de <i>Thapsia garganica L.</i> pulvérisée avec l'ABTS <sup>•+</sup> .....	61

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau I:</b> Principaux noms vernaculaires de <i>Thapsia garganica</i> L.....	5
<b>Tableaux II:</b> Classification botanique de <i>Thapsia garganica</i> L.....	5
<b>Tableau III:</b> Les principales espèces oxygénées réactives.....	10
<b>Tableau IV:</b> Activités biologiques des composés polyphénoliques.....	23
<b>Tableau V:</b> Les pourcentages d'extraction pour chaque extrait de <i>Thapsia garganica</i> L.....	41
<b>Tableau VI:</b> les valeurs des IC <sub>50</sub> des différents extraits de <i>Thapsia gargana</i> L.....	52
<b>Tableau VII:</b> les couleurs des bandes des extraits après révélation avec la vanilline sulfurique .....	57
<b>Tableau VIII :</b> Les couleurs des bandes des extraits sous UV.....	59

---

## *Sommaire*

**La liste des abréviations****La liste des figures****La liste des tableaux****Introduction**.....1**Synthèse Bibliographique****Chapitre I : Généralité sur *Thapsia garganica* L.**

## I-1-Généralités sur les Apiacées.....3

I-2-Le genre *Thapsia* et son habitat.....3I-3- L'espèce *Thapsia garganica* L.....3

## I-4-Noms vernaculaires de l'espèce.....4

## I-5- Classification botanique.....4

I-6-Description botanique de *Thapsia garganica* L.....4I-7- Compositions chimique de *Thapsia garganica* L.....5

## I-8-Toxicité.....7

I-9-Activités biologiques de *Thapsia garganica* L.....7

## I-10-Utilisation thérapeutique de la plante.....8

**Chapitre II: Radicaux libres et Antioxydants**

## I-Les radicaux libres.....9

## I-1-Définition.....9

## I-2-Les radicaux libres en biologie.....9

## I-3-Génération des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et du nitrogène (ERN).....9

## I-3-1- Les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques.....9

## I-3-2-Les sources des ERO et ERN.....11

## I-4-Rôle physiologique des radicaux libres.....13



I-5-Stress oxydant .....	13
I-5-1-Définition.....	13
I-5-2-Conséquences du stress oxydant.....	14
I-4-3-Pathologies liées au stress oxydant .....	16
II-Les antioxydants.....	18
II-1-Définition des antioxydants.....	18
II-2-1-Les antioxydants enzymatiques.....	18
II-2-2-Les antioxydants non enzymatiques .....	19
II-2-3-Les composés phénoliques.....	21
<b>Partie expérimentale</b>	
<b>I-Matériels et méthodes.....</b>	<b>29</b>
I-Préparation du matériel végétal .....	29
I-1-1-Récolte de la plante.....	29
I-2-2- Séchage et broyage.....	29
I-2-3-Tamisage.....	29
I-2-Extraction des composés phénoliques totaux.....	30
I-3-Dosage des différents groupes de composés phénoliques.....	30
I-3-1-Dosage des composés phénoliques totaux.....	31
I-3-2-Dosage des flavonoïdes.....	32
I-3-3- dosage des proanthocyanidines.....	34
I-4-Activité antioxydante des extraits.....	35
I-4-1-Activité « scavenging » du radical DPPH.....	35

---

I-4-2- Evaluation de l'activité anti-radicalaire par le test de réduction du radical-cation ABTS <sup>•+</sup> .....	37
I-4-3- Le pouvoir réducteur.....	38
I-5- Caractérisation des extraits des feuilles et des racines de <i>Thapsia garganica</i> L.....	39
I-5-1- Fractionnement des extraits.....	39
I-5-2- Caractérisation de l'activité antioxydante.....	40
I-6- Etude statistique.....	40
<b>II- Résultats et discussion</b>	
II-1- Rendement de l'Extraction.....	41
II-2- Dosage des composés phénoliques.....	42
II-2-1- Les phénols totaux.....	42
II-2-2- Les flavonoïdes.....	44
II-2-3- Les pro-anthocyanidines.....	46
II-3- L'activité antioxydantes de <i>Thapsia garganica</i> L.....	47
II-3-1- L'activité scavenging du radical DPPH.....	47
II-3-2- Activité scavenging du radical ABTS <sup>•+</sup> .....	48
II-3-3- Le pouvoir réducteur.....	53
II-4- Caractérisation des extraits des feuilles et des racines de <i>Thapsia garganica</i> L.....	55
II-4-1- Fractionnement des extraits.....	55
II-4-2- Caractérisation de l'activité antioxydant.....	59
<b>Conclusion et perspectives</b> .....	63
<b>Références bibliographiques</b> .....	65

**Annexes**

# *INTRODUCTION*

## Introduction

Au travers des âges, l'homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base : nourriture, abris, vêtements et également pour ses besoins médicaux. L'utilisation thérapeutique des vertus des plantes pour le traitement de toutes les maladies de l'homme est très ancienne et évolue avec l'histoire de l'humanité (**Gurif ; 2006**). Malgré le progrès remarquable de la chimie organique synthétique du vingtième siècle, plus de 25% des médicaments prescrits dans les pays industrialisés dérivent directement ou indirectement des plantes (**Karou et al., 2005**).

Le stress oxydatif est défini comme étant une oxydation excessive due à un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène et celle des systèmes antioxydants. Ces espèces prooxydantes sont responsables de la dénaturation et de l'altération des molécules biologiques et engendrent de ce fait l'apparition de diverses pathologies dégénératives (**Pasquier, 1995**).

Les métabolites secondaires d'origine végétale font l'objet de nombreuses recherches dans la lutte contre le stress oxydatif, notamment dans la recherche de nouvelles molécules telles que les composés phénoliques, huiles essentielles et alcaloïdes auxquels on attribue différentes propriétés biologiques.

*Thapsia garganica* L. occupe une place privilégiée dans le traitement de certaines pathologies. Effectivement, les racines ont été utilisées pour le traitement des maladies pulmonaires, la cataracte et les arthrites rhumatoïdes (**Nelson et Stoltz, 2007**). Elle appartient à la famille des Apiacées. Ces dernières sont une famille de plantes dicotylédones très homogène, une des plus faciles de la flore à reconnaître, grâce à ses inflorescences en ombelles (**Guignard, 1998**).

Par conséquent, notre travail sera porté sur l'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* des extraits des feuilles et des racines de *Thapsia garganica* L. Pour cela, nous nous sommes fixés les objectifs suivants :



- Extraction des composés phénoliques contenus dans les feuilles et les racines de *Thapsia garganica L.*
- Dosage des composés phénoliques totaux, des flavonoïdes et des proanthocyanidines des extraits obtenus.
- Evaluation de l'effet anti-radicalaire et de l'activité antioxydante de ces extraits par la mesure du pouvoir réducteur et par l'utilisation de radicaux libres synthétiques : le DPPH et l'ABTS<sup>o+</sup>.
- Fractionnement et caractérisation de l'activité antioxydante des extraits.

*SYNTHÈSE*  
*BIBLIOGRAPHIQUE*

# *Chapitre I*

*Généralité sur*

*Thapsia garganica L.*

### I-1-Généralités sur les Apiacées

Les Apiacées, anciennement appelées Ombellifères, comprennent environ 3000 espèces se répartissant dans toutes les régions tempérées mais surtout dans l'hémisphère Nord. C'est une famille très homogène facile à reconnaître grâce à son inflorescence en ombelles composées. Paradoxalement, les espèces de cette famille sont assez difficiles à différencier les unes des autres (**Gaussen et al., 1982**).

### I-2-Le genre *Thapsia* et son habitat

*Thapsia* est un genre de plante à fleurs avec 41 espèces, appartenant à la famille des Apiacées qui sont originaires d'Afrique, d'Asie et d'Europe. *Thapsia garganica* L. est une espèce répandue dans le bassin méditerranéen, qui a pour habitat le bord des routes et les champs (**Gómez, 2007**).

*Thapsia garganica* L. est présente au Maroc, en Algérie, en Tunisie et en Lybie (**Dobignard et Chatelain, 2011**), mais aussi en Turquie, en Espagne, au Portugal, en Italie et en Grèce (**Hand, 2011**). Dans la région de l'Achach, au Maroc, elle apprécie les clairières forestières, les pâturages sablonneux et rocaillieux, les steppes, dans la plaine et les basses montagnes (**Bammi et Douira, 2004**).

### I-3- L'espèce *Thapsia garganica* L.

D'après **Lauzer, (1868)**, le nom *Thapsia garganica* L. est composé de deux mots:

- *Thapsia* : tiré de l'île de Thapsos où elle fut découverte pour la première fois.
- *garganica* : épithète donné par rapport au nom d'une montagne en Italie « Gargano » où elle se trouve en abondance.

### I-4-Noms vernaculaires de l'espèce

**Tableau I** : Principaux noms vernaculaires de *Thapsia garganica* L.

Langue	Nom	Référence
Français	Thapsie ou Faux fenouil	<b>Hseini et al., 2007</b>
Berbère	Aderyes	
Arabe	Bou nâfa ou Derias	<b>Rohlfs, 2002 ; Wassel et Ahmed, 1974</b>
Anglais	False fennel	



### I-5- Classification botanique

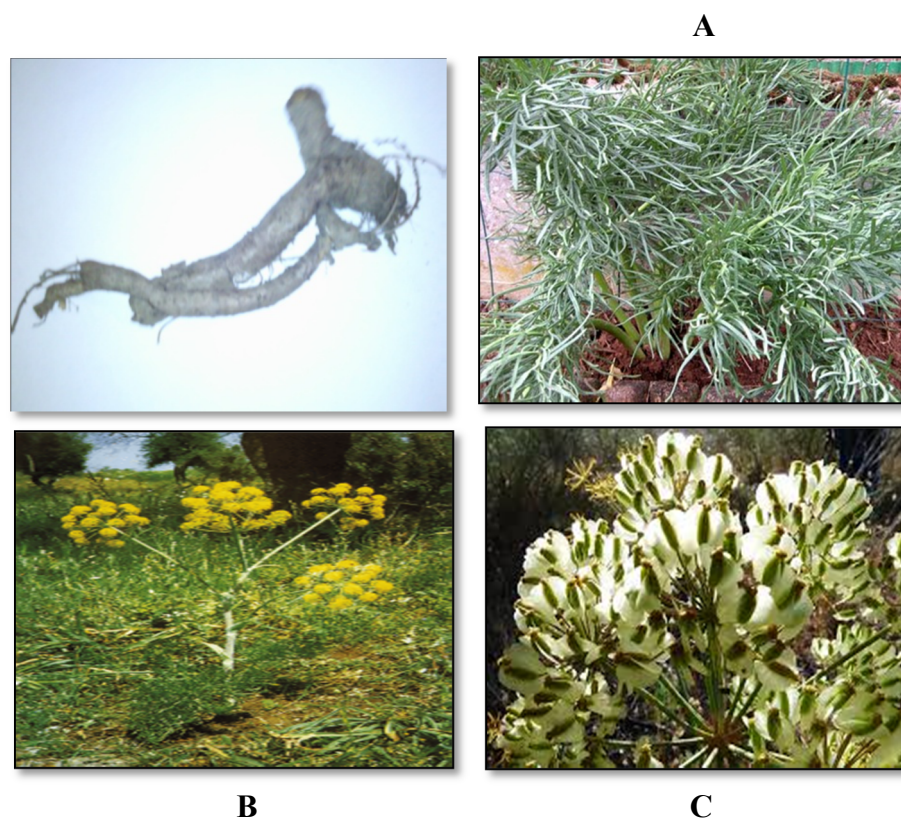
La systématique botanique permet de classer *Thapsia garganica* L. parmi les 3000 espèces distribuées en 300 genres (Gómez, 2007).

**Tableau II:** Classification botanique de *Thapsia garganica* L. (Gómez, 2007).

<b>Division</b>	<b>Angiospermes</b>
<b>Classe</b>	Dicotylédones
<b>Sous-classe</b>	Archychlamideae
<b>Ordre</b>	Umbeliflorales
<b>Famille</b>	Umbelliferae = Apiaceae
<b>Genre</b>	<i>Thapsia</i>
<b>Espèce</b>	<i>Thapsia garganica</i> L.

### I-6- Description botanique de *Thapsia garganica* L.

C'est une Plante vivace, à tige florifère dressée, peu ramifiée, atteignant environ 1,50 m de haut. Elle possède de grandes feuilles en touffes, très découpées, à division linéaire pourvues d'un pétiole en gaine à la base, les supérieurs sont réduits à la gaine épaisse, d'un vert grisâtre comme la tige. Les fleurs sont petites, jaunes disposées en grandes ombelles presque sphériques. Les fruits sont ovales, atteignant plus de 2 cm de long, largement ailés. Les racines sont des rhizomes (figure n°1). La floraison a lieu entre avril et juillet (Meftah et al., 2001).



**Figure n°1** : Photographies des racines et des parties aériennes de *Thapsia garganica* L.  
(Anonymes A: feuilles, B: fleurs, C: graines)

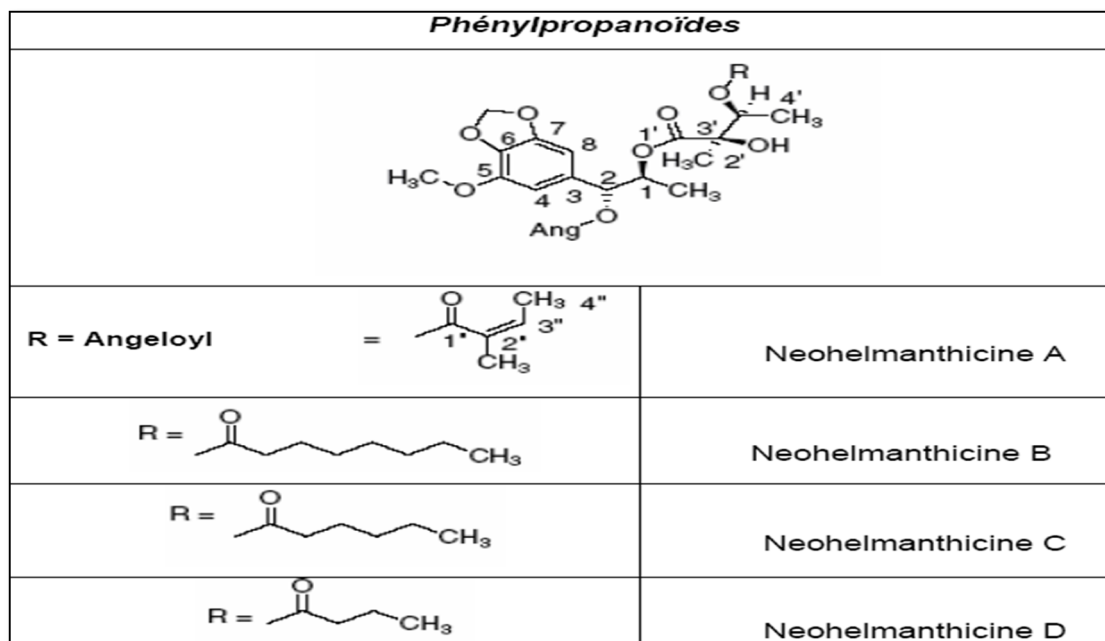
#### I-7- Composition biochimique de *Thapsia garganica* L.

*Thapsia* est un genre complexe, non seulement du point de vue taxonomique, mais aussi dans la nature des métabolites isolés et leur distribution dans ses espèces (Saouf et al., 2006).

##### a) Les composés phénoliques

Djeridane et al., (2007) ont révélé que la composition phénolique des extraits éthanoliques de *Thapsia garganica* L. était relativement faible, soit de 2,5 mg équivalent acide gallique par 1g de matière sèche. L'analyse par HPLC de ces extraits a révélé que les flavonoïdes représentent 98% (m/m) des composés phénoliques totaux avec détection de la quercétine, et que les dérivés de l'acide hydroxycinnamique en représentent 2% (m/m), par contre les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque sont inexistant.

Liu et al., (2006) ont quant à eux montré l'existence d'esters de phénylpropanoïdes (Figure n°2) dans les extraits de *Thapsia garganica* L.



**Figure n°2** : Structures des phénylpropanoïdes isolés à partir de *Thapsia garganica* L. **Liu et al., (2006).**

### b) Composés terpéniques

Les composés terpéniques que l'on retrouve essentiellement chez le genre *Thapsia* sont des lactones sesquiterpéniques (**adjel et al., 2011**). Ces composés constituent un groupe numériquement important de substances à environ 3000 structures connues qui furent décrites dans les anciens traités de matières Médicinales, sous le nom évocateur de « **principes amers** ». Leurs structures sont très variées, mais se rattachent toutes au produit de cyclisation, cyclodécadiénylique du pyrophosphate farnésyle (FPP) (**Bruneton, 1993**).

Les composants dominants de cette plante sont des thapsigargines qui appartiennent au groupe des guaianolides, et des thapsigargicines (Figure n°3) (**Rubal et al., 2007**), ainsi que les constituants volatiles suivants : les lactones sesquiterpènes  $\delta$ -cadinene,  $\alpha$ - et  $\delta$ -guaïene, elemol et guaïols (**Drew et al., 2009**).

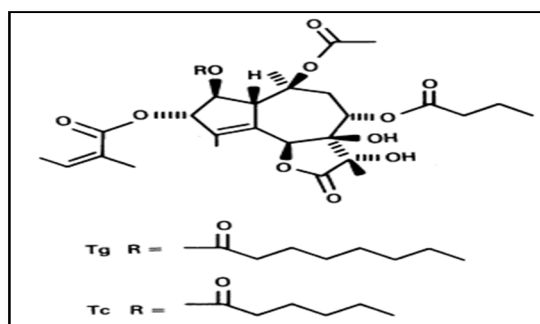


Figure n°3 : Structure de la thapsigargine et de la thapsigarginicine (Ali *et al.*, 1985).

### c) Les huiles essentielles

L'huile essentielle extraite des racines contient principalement de l'élimicine (54 à 73 %) et de la latifolone (20–32%) (Avato *et al.*, 2001).

### 1-8- Toxicité

Les Apiacées et en particulier *Thapsia garganica* L. sont des plantes assez toxiques. Cette toxicité est principalement due à la présence des alcaloïdes pipéridiniques (grande ciguë), des carbures acétyléniques poly-insaturés (ciguë aquatique, œnanthe safranée) ou à des lactones sesquiterpéniques. La présence fréquente de furanocoumarines dans leurs tissus fait qu'elles sont souvent photosensibilisantes (Bruneton, 2005).

### 1-9-Activités biologiques de *Thapsia garganica* L.

#### ✚ Différentes actions de la Thapsigargine

##### ➤ Cytotoxicité

Liu *et al.*, (2006) ont mené une étude sur la cytotoxicité de la Thapsigargine et des esters des phénylpropanoïdes isolés à partir des fleurs de *Thapsia garganica* L. Les tests ont été effectués sur des lignées cellulaires cancéreuses de la leucémie et du carcinome du sein. Les IC<sub>50</sub> ont révélé que la Thapsigargine possède un potentiel cytotoxique plus élevé par rapport aux esters de phénylpropanoïdes.

##### ➤ Libération d'histamine et réponse inflammatoire

Ali *et al.*, (1985) ont montré que la Thapsigargine était capable d'induire l'activation des mastocytes et des leucocytes, provoquant la libération d'histamine impliquée dans les réactions d'hypersensibilité et inflammatoires.

### ➤ Action sur le métabolisme du calcium

La Thapsigargine est un inhibiteur spécifique des ATPases- $\text{Ca}^{2+}$  SERCA (protéines membranaires qui pompent le calcium à l'intérieur du réticulum) qui représentent des protéines indispensables à la survie cellulaire (**Winther et al., 2010 ; Rubal et al., 2007 ; Kmoníčková et al., 2008**).

La Thapsigargine, qui possède une forte affinité pour les SERCA, inhibe sélectivement les ATPases du réticulum sarco-endoplasmique sans affecter les pompes de la membrane plasmique et mitochondriale, ainsi elle provoque la décharge du calcium stocké dans ces compartiments, provoquant une augmentation accrue de la concentration cytosolique du calcium et un changement de la perméabilité de la membrane plasmique, entraînant ainsi un afflux du calcium extracellulaire (**Appendino et al., 2005**).

### ➤ Cancer de la prostate et apoptose

La Thapsigargine est connue pour ses effets bénéfiques dans le traitement du cancer de la prostate (**Makunga et al., 2006 ; Liu et al., 2006**). Lorsque la Thapsigargine est liée de façon covalente à un peptide spécifique (la carboxypeptidase), elle représente une pro-drogue qui peut cibler et après activation, tuer par apoptose les cellules du cancer de la prostate (**Winther et al., 2010; Rubal et al., 2007**).

## I-10-Utilisation thérapeutique de la plante

*Thapsia garganica* L. est une plante médicinale répandue dans la thérapeutique traditionnelle. Elle est connue pour ses effets diurétiques, émétiques et purgatifs. La plante a toujours été considérée comme spécifique dans le traitement de la douleur, mais la prudence est recommandée car elle est toxique pour certains mammifères. La plante est également fortement rubéfiante, produisant des cloques et des démangeaisons intenses (**Ladjel et al., 2011**).

La plante est utilisée pour combattre les toux et bronchites rebelles ainsi que les rhumatismes, la rage et la stérilité féminine. On l'utilise également, mélangée à de la farine et à du son, en cataplasmes, contre les morsures d'animaux venimeux ou enragés (**Bammi et Douira, 2002**).

# *Chapitre II*

*Radicaux Libres et Antioxydants*

## I- Les radicaux libres

### I-1-Définition

Il s'agit d'un atome ou d'une molécule qui contient un (ou plusieurs) électron(s) non apparié(s), comme conséquence de la perte d'un (ou plusieurs) électron(s) de l'orbite externe, aboutissant à la formation d'une demi liaison qu'il faut satisfaire par un pillage local d'électron(s) (**Berger, 2006**). D'après **Goudable et Favier (1997)**, cela lui confère une grande réactivité et donc une demi-vie très courte. En effet, ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable : il va donc se réduire en oxydant un autre composé.

### I-2-Les radicaux libres en biologie

En biologie, les radicaux libres sont formés le plus souvent par gain d'électrons à partir de l'oxygène (**Koehler-Ramonatxo, 2006**). Les espèces prooxydantes sont représentées par les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les espèces réactives du nitrogène (ERN) (**Groussard, 2006**), qui sont les produits du métabolisme cellulaire normal et à des concentrations faibles à modérées elles sont connues pour leurs rôles physiologiques variés allant de la transduction du signal cellulaire à la défense contre les pathogènes (**Dastmalchi et al., 2007**).

Les radicaux libres les plus courants sont le radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ) et le monoxyde d'azote ( $NO^{\cdot}$ ). D'autres molécules, comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et l'ion peroxydite ( $ONOO^-$ ) ne sont pas des radicaux libres mais ils peuvent en générer par différentes réactions chimiques (**Ré et al., 2005**).

### I-3-Génération des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et du nitrogène (ERN)

#### I-3-1- Les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques :

Les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques tableau n°III.

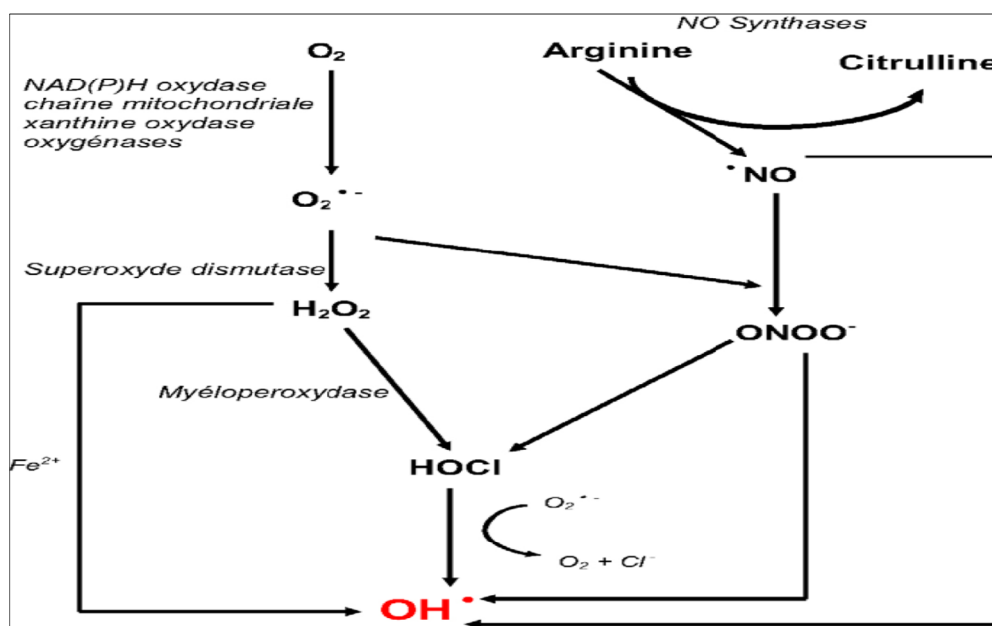
**Tableau n° III:** Les principales espèces oxygénées réactives (Amzal, 2010).

Espèces réactives	Propriétés
$O_2^{\cdot -}$ Anion Superoxyde	Produit par la chaîne de transport d'électrons et d'autres sites. Ne peut pas diffuser du site d'origine. Génère les ROS.
$H_2O_2$ Peroxyde d'hydrogène	N'est pas un radical libre, mais peut en générer en réagissant avec des métaux de transitions, peut diffuser à travers les membranes.
$OH^{\cdot}$ Radical Hydroxyle	Espèce la plus réactive dans l'attaque des molécules biologiques, produit à partir du $H_2O_2$ dans la réaction de Fenton (R1) en présence du $Fe^{2+}$ ou du $Cu^{2+}$ ou par réaction du peroxyde d'hydrogène avec l'anion superoxyde par la réaction de Haber-Weiss (R2). $H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow OH^{\cdot} + Fe^{3+} + OH^- \quad (R1)$ $H_2O_2 + O_2^{\cdot -} \longrightarrow HO^{\cdot} + OH^- + O_2 \quad (R2)$
$HOCl$ Acide Hypochloreux	Produit dans les neutrophiles durant le sursaut respiratoire pour détruire les organismes invasifs. La toxicité s'effectue à travers des réactions d'halogénations et d'oxydations. L'espèce réactive est l' $OCl$ .
$^1O_2$ Oxygène Singulet	Oxygène avec des spins antiparallèles. Produit à des pressions importantes en oxygène sous l'effet de l'absorption des rayons UV. Il disparaît trop vite pour être toxique <i>in vivo</i> .
$NO^{\cdot}$ Oxyde Nitrique	Un radical libre endogène produit par l'oxyde nitrique synthétase. Se lie aux ions métalliques, se combine avec $O_2$ ou aux autres radicaux contenant l'oxygène pour produire RNOS
$ONOO^-$ Peroxynitrite	Un agent oxydant puissant qui n'est pas un radical libre. Il peut générer $NO_2$ (dioxyde de nitrogène), qui est un radical.



### I-3-2-Les sources des ERO et ERN

La production et le métabolisme des ERO apparaissent très compartimentés et indépendants dans les différents compartiments cellulaires. Plusieurs systèmes dont les deux principaux sont la chaîne mitochondriale et les NADPH oxydases (Figure n°4) contribuent à la production des ERO dans les cellules (**Bonnefont-Rousselot et al., 2002**).

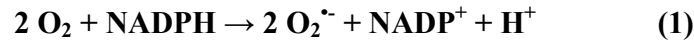


**Figure n°4:** Sources cellulaires et interconversions des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN) (**Beaudeau et al., 2006**).

#### ➤ NADPH oxydase

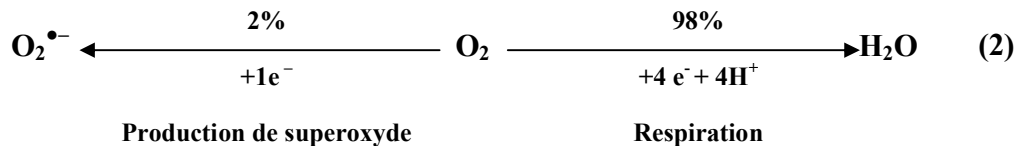
La NADPH oxydase est une enzyme cellulaire initialement retrouvée dans les cellules phagocytaires, à l'origine de la production extracellulaire d'anions superoxydes nécessaires à la destruction d'éléments étrangers qui seront finalement phagocytés (**Parihar et al., 2008**).

Des études récentes ont montré que les NADPH oxydases des cellules vasculaires constituent une source majeure d'ERO, particulièrement, du radical superoxyde  $O_2^{\cdot -}$  par transfert d'un électron sur l'oxygène (réaction 1) (**Bonnefont-Rousselot et al., 2002**).



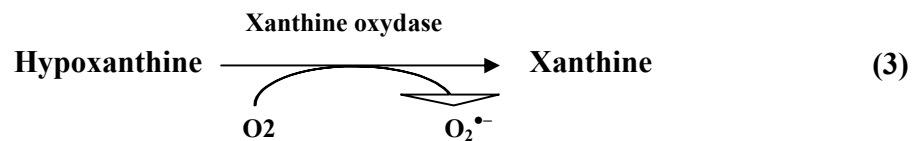
➤ **La mitochondrie**

Elle est considérée comme une des principales sources d'ERO dans la cellule par le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (**Pervaiz et Clement, 2007**). Dans la mitochondrie à l'état physiologique, il existe lors du transport électronique le long de la chaîne respiratoire, une fuite d'électrons au niveau du complexe I et III, à l'origine de la production de l' $\text{O}_2^{\bullet -}$  (réaction 2) (**Ballinger, 2005**). Aussi la plupart du  $\text{H}_2\text{O}_2$  cellulaire provient des mitochondries par dismutation d' $\text{O}_2^{\bullet -}$  (**Beaudeau et al., 2006**).



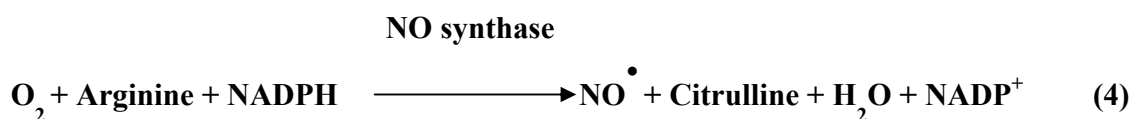
➤ **Xanthine oxydase**

La xanthine oxydase fait partie d'un autre système enzymatique capable de générer le  $\text{O}_2^{\bullet -}$  par transfert d'un électron sur l'oxygène (**Bonnefont-Rousselot et al., 2002**). Dans les situations d'hypoxie ou d'ischémie suivie de reperfusion, l'activation intracellulaire de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase va provoquer une formation importante de  $\text{O}_2^{\bullet -}$  en présence d'oxygène (réaction 3) (**Goudable et Favier, 1997; Deby-Dupont et al., 2002**).



➤ **L'oxyde Nitrique synthétase**

La NO synthase est une flavoenzyme calcium dépendante qui va produire du  $\text{NO}^{\bullet}$  grâce à l'oxydation de la L-arginine par l'oxygène (réaction 4) (**Bérard, 1997; Huet et Duranteau, 2008**).



#### I-4- Rôle physiologique des radicaux libres

Dans un système biologique, les ERO libres peuvent avoir des effets opposés, et ce en fonction de leur lieu de formation et des quantités produites (**Flourie et al., 2006**). Les ERO, lorsqu'elles sont formées en faibles concentrations, représentent des régulateurs des voies de signalisation et de l'expression des gènes au niveau des cellules vasculaires, jouant ainsi un rôle important comme seconds messagers, dans le contrôle des processus cellulaires physiologiques tels que la croissance, la migration, la sénescence, l'apoptose ou la survie des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses (**Bonnefont-Rousselot et al., 2002; Huet et Duranteau, 2008**), aussi bien que dans les fonctions de: phagocytose, bactéricidie et stimulation des lymphocytes T (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**).

A titre d'exemple, l'anion radicalaire superoxyde ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) et le monoxyde d'azote ( $\text{NO}^\bullet$ ) sont des médiateurs régulant certaines fonctions biologiques telles que la vasodilatation capillaire, la prolifération ou encore la signalisation nerveuse (**Favier, 2003**). Les oxydants chlorés ( $\text{HOCl}$ ) quant à eux, sont libérés par les macrophages et ont une activité bactéricide importante (**Barouki, 2006**).

#### I-5-Stress oxydant

##### I-5-1-Définition

Le stress oxydant est communément défini comme un déséquilibre entre les systèmes oxydants et les capacités anti-oxydantes d'un organisme, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire (**Reimund, 2002 ; Barouki, 2006**).

### I-5-2-Conséquences du stress oxydant

Lors d'un stress oxydant, les ERO non « détoxiquées » par le système antioxydant attaquent et endommagent par oxydation des macromolécules directement à leur contact, contenues dans les cellules, notamment les lipides, les protéines et l'ADN (figure n°5) (Koechlin-Ramonatxo, 2002; Halliwell, 2007).

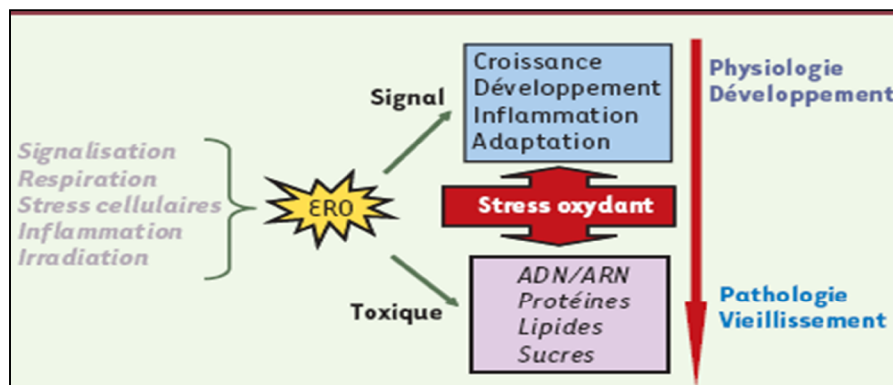


Figure n°5: conséquence de stress oxydatif (Barouki, 2006).

#### ➤ Peroxydation lipidique

Les ERO peuvent s'attaquer aux lipides et plus particulièrement aux acides gras polyinsaturés des phospholipides membranaires. Les conséquences de cette peroxydation sont nombreuses. Parmi elles, la réorganisation ainsi que l'agglomération des phospholipides, une fluidité des membranes abaissée et cela peut même entraîner la disparition des compartiments cellulaires, la désorganisation complète de la membrane altérant de ce fait ses fonctions d'échange, de barrière et d'information (figure n° 6) (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

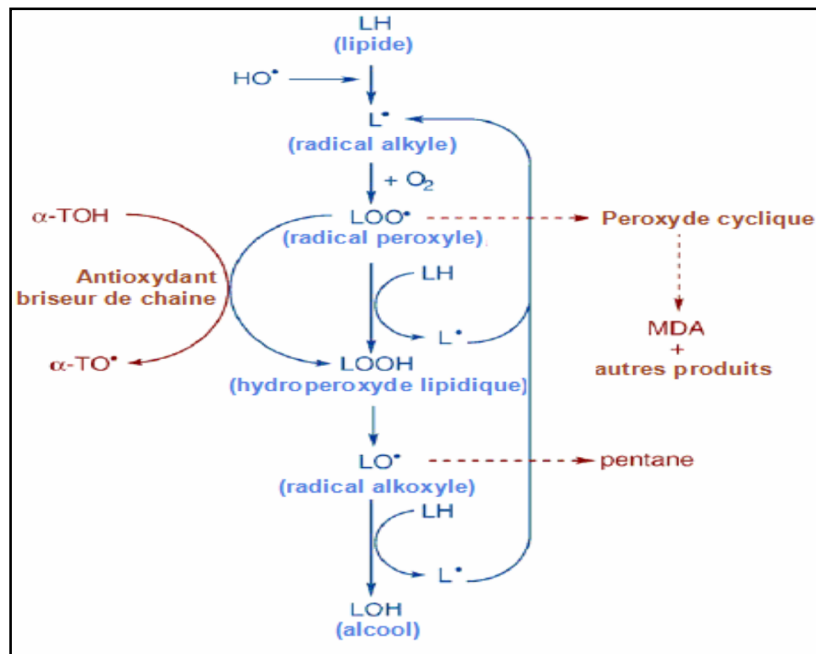
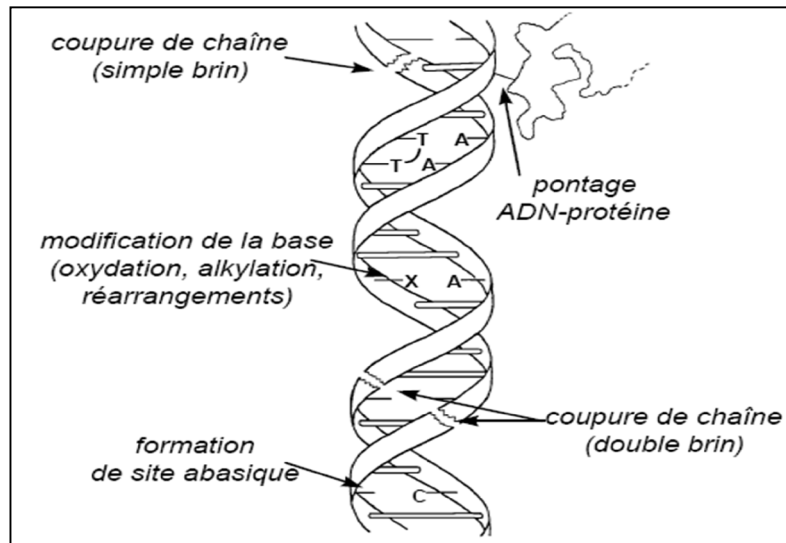


Figure n°6 : Les trois étapes de la peroxydation lipidique (Sachdev et Davies, 2008).

### ➤ Oxydation de l'ADN

L'ADN, qu'il soit nucléaire ou mitochondrial, est également une cible majeure des ERO. Les radicaux  $O_2^{\bullet-}$  et  $OH^{\bullet}$  provoquent des lésions de l'ADN. Ceux-ci peuvent en effet interagir avec les désoxyriboses de l'ADN mais aussi avec ses bases puriques et pyrimidiques. Ces altérations structurales lorsqu'elles ne sont pas réparées entraînent à long terme des altérations génétiques: cassures chromosomiques, mutations, délétions, amplifications, à l'origine d'un dysfonctionnement au niveau du métabolisme protéique (Figure n°7) (Koechlin-Ramonatxo, 2006).



**Figure n°7 :** Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (Favier, 2003).

### ➤ Oxydation protéique

Les ERO sont en effet capables de réagir avec différents acides aminés des chaînes des protéines, altérant ainsi leur fonction. Les plus sensibles à leur action sont les acides aminés aromatiques comme le tryptophane, la tyrosine, l'histidine, sur lesquels le radical  $\text{OH}^\bullet$  s'additionne, modifiant la conformation de la protéine. Sur les acides aminés contenant un atome de soufre tels que la cystéine et la méthionine, l'oxydation par les radicaux libres conduit à la formation de ponts disulfures, donc à l'agrégation de plusieurs molécules de protéines. Les ERO sont aussi capables de couper des liaisons peptidiques et de former ainsi des fragments protéiques (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques (enzyme, anti-enzyme, récepteur...) et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases et notamment du protéasome (Favier, 2003).

### I-5-3-Pathologies liées au stress oxydant

L'importance du stress oxydant et des ERO dans leur physiopathologie a été évoquée depuis longtemps.

De plus en plus des d'études en font actuellement la démonstration (Forceville et Van Antwerpen, 2008). Le stress oxydant est impliqué à la fois dans des pathologies liées au vieillissement et dans de nombreuses affections telles que l'athérosclérose, les lésions d'ischémie-reperfusion, les affections inflammatoires et neurodégénératives (Durand et al., 2005).

Parmi les RLO, l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) joue un rôle clé dans l'inflammation en général, et dans les maladies rhumatismales en particulier. L'enzyme superoxyde dismutase (SOD) est impliquée dans la neutralisation de l' $O_2^{\bullet-}$  en le transformant en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), évitant ainsi la formation de dérivés plus toxiques comme la peroxy-nitrite ( $ONOO^-$ ) ou le radical hydroxyle ( $HO^\bullet$ ).

Une grande partie de la connaissance sur le rôle de l' $O_2^{\bullet-}$  en pathologie articulaire a été acquise indirectement par la présence de résidus nitrotyrosine dans le cartilage de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (PR) ou par l'action de l' $ONOO^-$  *in vitro*, démontrant que l'association de l' $O_2^{\bullet-}$  avec le  $NO$  est délétère pour le cartilage (Figure n°8) (Afonso, 2007).

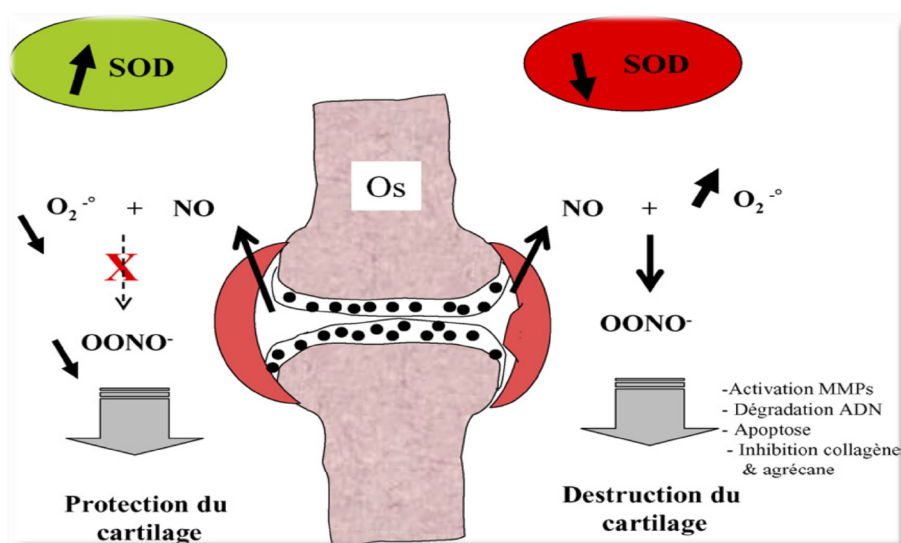


Figure n°8 : Destruction du cartilage par le  $OONO^-$  (Afonso et al., 2007).

## II- Les antioxydant

### II-1-Définition

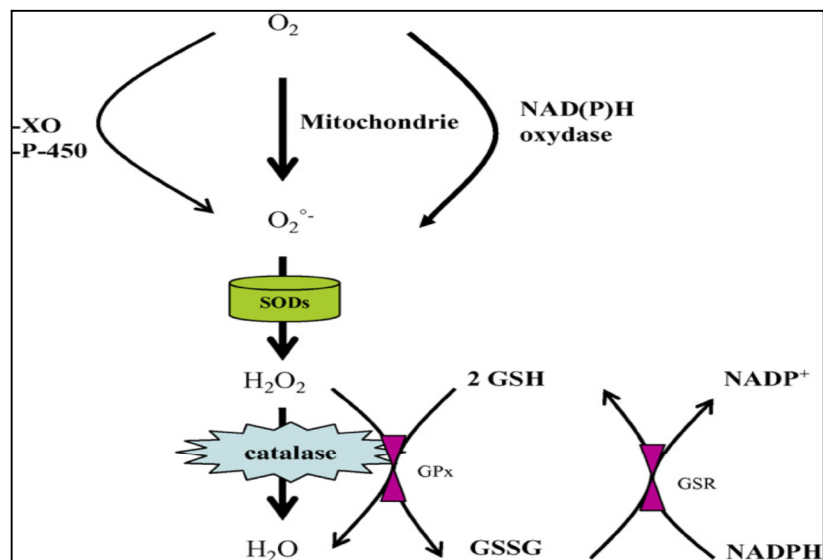
Les antioxydants sont des agents redox qui réagissent avec les oxydants et stoppent ou ralentissent le processus d'oxydation, et régulent ainsi l'équilibre redox cellulaire (Cuvelier *et al.*, 2003), à des concentrations très faibles dans le milieu où ils interviennent (Berger, 2006 ; Pincemail *et al.*, 1998).

### II-2-Les différents types d'antioxydants

Face à la production permanente des ERO, les organismes vivants ont développé des systèmes de défense antioxydants enzymatiques et non enzymatiques (Hénaff, 2006).

#### II-2-1-Les antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques sont des systèmes de défense primaire constitués d'enzymes telles que la superoxyde-dismutase, la catalase et la glutathion-peroxydase (figure n°9) (Pincemail *et al.*, 2004).



**Figure n°9:** Sources métaboliques de production et d'élimination des radicaux libres (Afonso *et al.*, 2007).

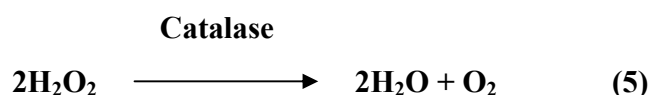


➤ **Les superoxydes-dismutases (SOD)**

Ce sont des métalloenzymes (Nicholls, 2012) qui catalysent la dismutation de l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et en oxygène ( $O_2$ ) (Parihar et al., 2008).

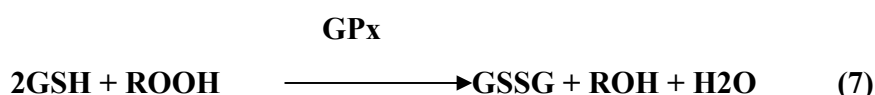
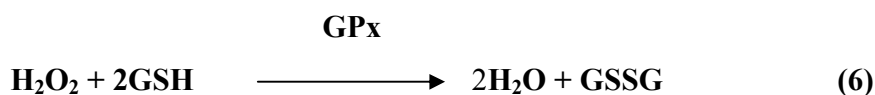
➤ **Les catalases**

Les catalases sont la classe d'enzymes qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en eau ( $H_2O$ ) et en oxygène gazeux ( $O_2$ ) (réaction 5) (Nicholls, 2012).



➤ **La glutathion peroxydases (Gpx)**

La glutathion peroxydase (GPx) est une enzyme sélénodépendante dont le cofacteur est le glutathion (Laguerre et al., 2007). La GPx fait partie d'un système complet qui joue un rôle central dans le mécanisme d'élimination du  $H_2O_2$ , elle prend aussi en charge des lipides peroxydés (Servais, 2004 ; Valko et al., 2006), Selon les réactions (6) et (7) :



## II-2-2- Les antioxydants non enzymatiques

Les antioxydants non enzymatiques sont des systèmes de défense secondaires (Koechlin Ramonatxo, 2006) tels que la vitamine E, les caroténoïdes et les flavonoïdes (Afonso et al., 2007) ; à ceux là s'ajoutent quelques oligo-éléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs importants pour l'activité de certaines enzymes antioxydantes (Pincemail et Defraigne, 2004).

### a) Les vitamines

#### ➤ La vitamine E ou l' $\alpha$ -tocophérol (vit E)

Le rôle essentiel de la vitamine E (figure 10) est de capter les radicaux peroxydes lipidiques  $RO_2^\bullet$  qui propagent les chaînes de peroxydation. La partie active de la molécule étant la fonction phénol réductrice ( $\alpha$ -TH), celle-ci perd facilement un atome d'hydrogène et se transforme en radical  $\alpha$ -tocophéryle,  $\alpha$ -T $^\bullet$ , tandis que le radical peroxyde est réduit en une molécule d'hydroperoxyde réaction (8). De plus, l' $\alpha$ -tocophérol capte les radicaux superoxydes (sous leur forme protonée  $HO_2^\bullet$ ), les radicaux hydroxyles  $^\bullet OH$ , ainsi que l'oxygène singulet  $^1O_2$  (Gardès-Albert et *al.*, 2003).

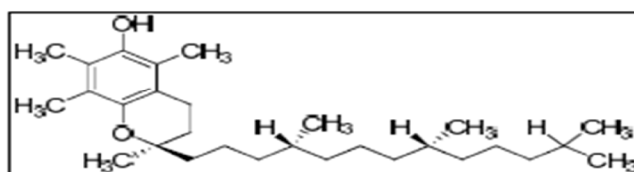
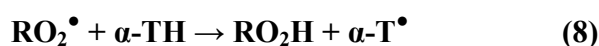


Figure n°10: Structure chimique de La vitamine E (Cuvelier et *al.*, 2003).

#### ➤ La vitamine C

La vitamine C possède une activité antioxydante par sa capacité à piéger le radical peroxyde ( $ROO^\bullet$ ), en oxydant l'acide ascorbique en acide déhydroascorbique, ou enfin par réduction du radical tocophéryle (figure n°11) (Zazzo, 2002).

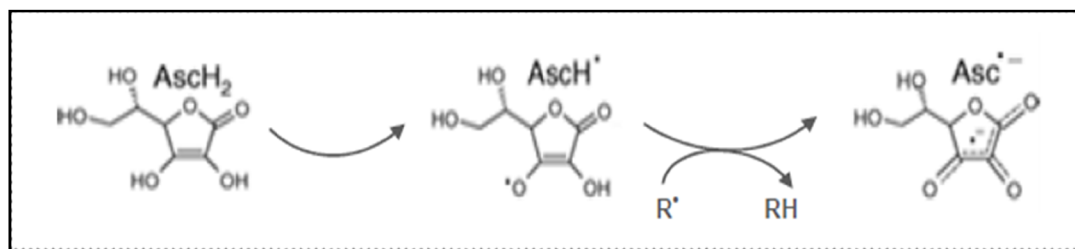


Figure n°11: Réaction entre l'acide ascorbique et un radical ( $R'$ ) (Valko et *al.*, 2006).

### ➤ Les caroténoïdes (la provitamine A)

Les caroténoïdes possèdent dans leur structure chimique de très nombreuses doubles liaisons conjuguées qui sont responsables de leur activité anti-oxydante (figure n°12). Ils sont susceptibles d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidique. En outre, le  $\beta$ -carotène est la molécule la plus connue comme étant un puissant désactivateur de l'oxygène singlet ( $^1\text{O}_2$ ) (réaction n°9) (Pincemail et al., 1999 ; Laguerre, 2007 ).

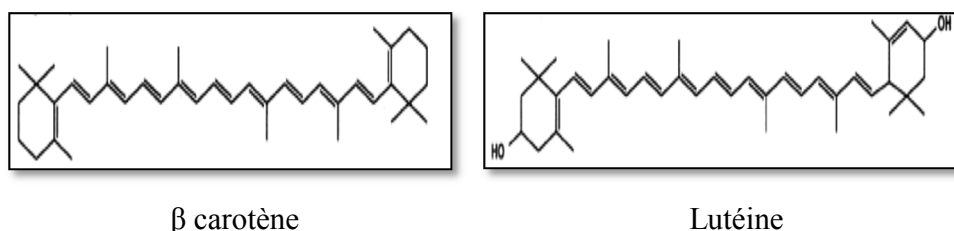
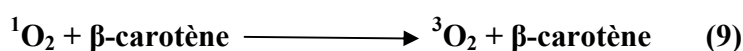


Figure n°12 : Structure des caroténoïdes (Laguerre, 2007)

### b) Les oligoéléments

Ils jouant le rôle d'antioxydants endogènes (Forceville et al., 2008) sont des matériaux présents en faible quantité dans un organisme, et sont utiles à son fonctionnement, en raison de leur implication effective dans des réactions biochimiques ou physico-chimiques (Khaled et al., 1997). Le cuivre et le zinc sont des cofacteurs de la SOD, ou le cuivre est indispensable à son activité enzymatique, tandis que le zinc joue un rôle structural. Il existe également une SOD mitochondriale utilisant le manganèse comme cofacteur, de la même façon la GPx utilise le sélénium comme cofacteur (Chisolfi-Marque et al., 1996).

### II-2-3-Les composés phénoliques

Les phénols sont des composés d'origine végétale (Dhiraj et al., 2005; Cheynier et al., 1998). Ce sont des composés possédant un ou plusieurs cycles aromatiques avec un ou plusieurs groupements hydroxyles, et généralement, ils sont catégorisés en acides phénoliques, flavonoides, stilbenes, coumarines et tannins.

Les phénols sont les produits du métabolisme secondaire chez les plantes, fournissant des fonctions essentielles dans la reproduction et la croissance des plantes, agissant dans les mécanismes de défense contre les pathogènes, parasites et prédateurs, aussi bien que contribuant à la couleur des plantes (**Liu et al., 2007**).

#### a) Biosynthèse des polyphénols

Selon **Bruneton (1999)**, les composés phénoliques sont issus de deux grandes voies :

➤ **Voie des Shikimates** : c'est la voie la plus courante, elle convertit les oses en acides aminés aromatiques, puis il y a désamination de ces derniers en acides cinnamiques et à leurs dérivés: coumarines, lignines et lignanes.

➤ **Voie des acétates** : elle conduit à des polyacétates, qui engendrent par cyclisation des composés souvent polycycliques : isocoumarine, quinone, xanthone.

➤ De plus, la diversité structurale des composés phénoliques est plus accrue par la possibilité, très fréquente, d'une participation simultanée du shikimate et de l'acétate à l'élaboration de composés d'origine mixte comme les flavonoïdes.

#### b) Propriétés biologiques des polyphénols

Les polyphénols sont dotés de certaines activités résumées dans le Tableau suivant IV (**Bahorun, 1997**).

**Tableau IV:** Activités biologiques des composés phénoliques (**Bahorun, 1997**):

<b>Polyphénols</b>	<b>Activités</b>
Acides Phénols (cinnamiques et benzoïques)	Antibactériennes Antifongiques Antioxydantes
Coumarines	Protectrices vasculaires et antioedémateuses
Flavonoides	Antitumorales Anticarcinogènes Anti-inflammatoires Hypotenseurs et diurétiques Antioxydantes
Anthocyanes	Protectrices capillaro-veineux
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur le collagène Antioxydantes Antitumorales Antifongiques Anti-inflammatoires
Tannins galliques et catéchiques	Antioxydantes

### c) Classification

Plus de 8000 structures phénoliques sont connues, allant de molécules phénoliques simples de bas poids moléculaire tels que les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés comme les tannins (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**).

#### ➤ Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont rares dans la nature à l'exception de l'hydroquinone qui existe dans plusieurs familles de plantes. Ils comportent deux groupes, les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques (Figure n°13) (**Bruneton, 1993**).

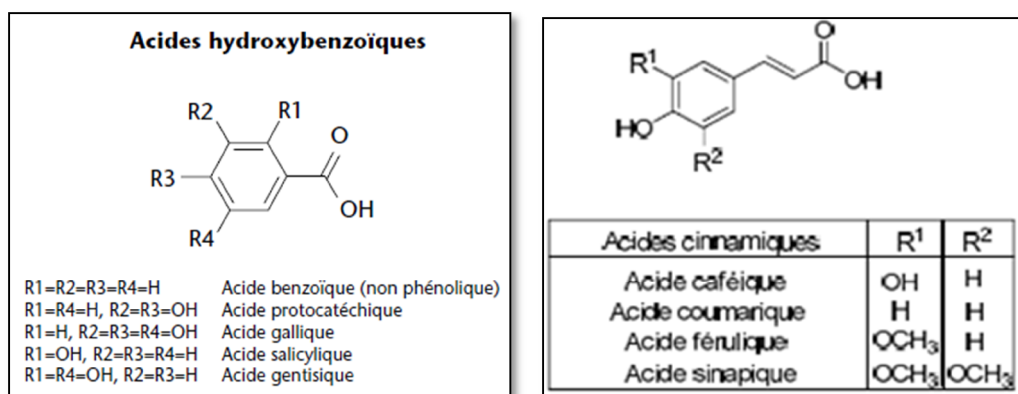


Figure n°13 : Structure chimique des acides phénoliques (Laguerre et al., 2007 ; Schofield et al., 2001).

### ➤ Les coumarines

Les coumarines sont des composés contenant des cycles de benzène fusionnés avec un  $\alpha$ -pyrone (figure n°14) (Lin et al., 2008).

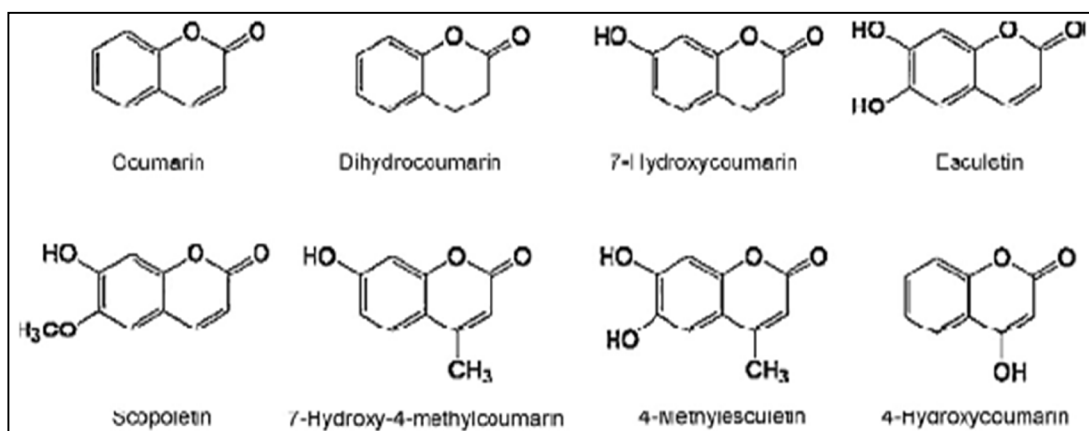


Figure n°14: Structures chimiques des dérivés de coumarines (Lin et al., 2008).

### ➤ Les tanins

Les tanins sont des métabolites secondaires importants dans le règne végétal. Ils s'intègrent dans la défense des végétaux contre les herbivores, en particulier pour les plantes se développant dans des zones difficiles (Zimmer et Cordesse, 1996).

### ▪ Les tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont formés par un cœur hydrocarbure, usuellement le D-Glucose, dont les groupements hydroxyyles peuvent présenter des liaisons esters avec les groupements phénoliques. Les tanins hydrolysables peuvent être appelés ellagitannins, lorsque seulement les acides ellagiques sont les groupements polyphénoliques liés au cœur hydrocarbure. Les gallotannins se présentent lorsque seulement les acides galliques sont liés au cœur hydrocarbure, et les tanins mixtes lorsque les deux, les acides ellagiques et galliques sont liés au même cœur hydrocarbure (figure 15) (Bossu et al., 2006).

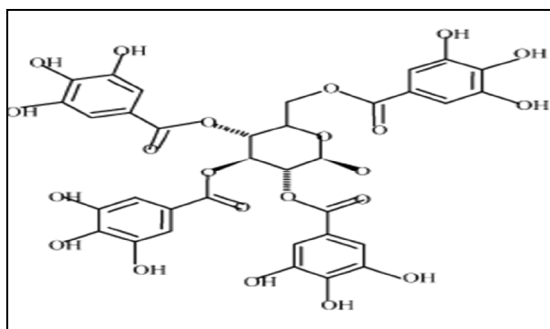


Figure n°15 : Structure d'un tanin hydrolysable (Krause et al., 2005).

### ▪ Les tanins condensés

Les tanins condensés ou proanthocyanidines sont des polymères d'unités flavaniques le plus souvent liées entre elles par des liaisons C4-C6 ou C4-C8 (figure 16) (Schofield et al., 2001).

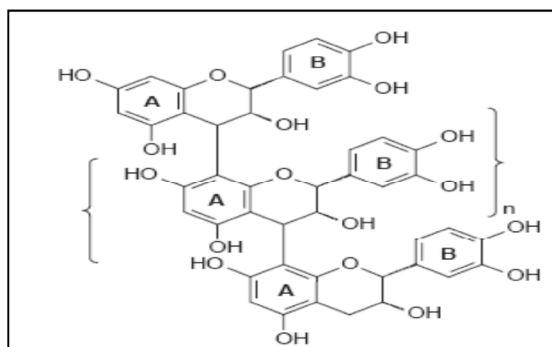


Figure n°16: Structure de base d'un tanin condensé (Krause et al., 2005).

## ➤ Les flavonoïdes

### ▪ Définition

Les flavonoïdes ont une structure basée sur le phénylchromane, un noyau pyrane accolé à un cycle benzénique, avec deux noyaux aromatiques (noyaux A et B) et un hétérocycle oxygéné (cycle C) (figure n°17) (Tsao et Deng, 2004).

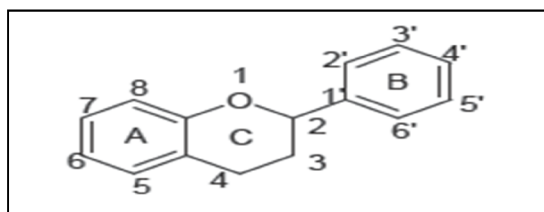


Figure n°17: Structure de base des flavonoïdes (Heim et al., 2002).

### ▪ Classification

Les flavonoïdes constituent un groupe de composés naturels très important. Ils sont présents dans toutes les plantes vasculaires et on en a identifié au moins 4000 (figure n°18) (Ren et al., 2003).

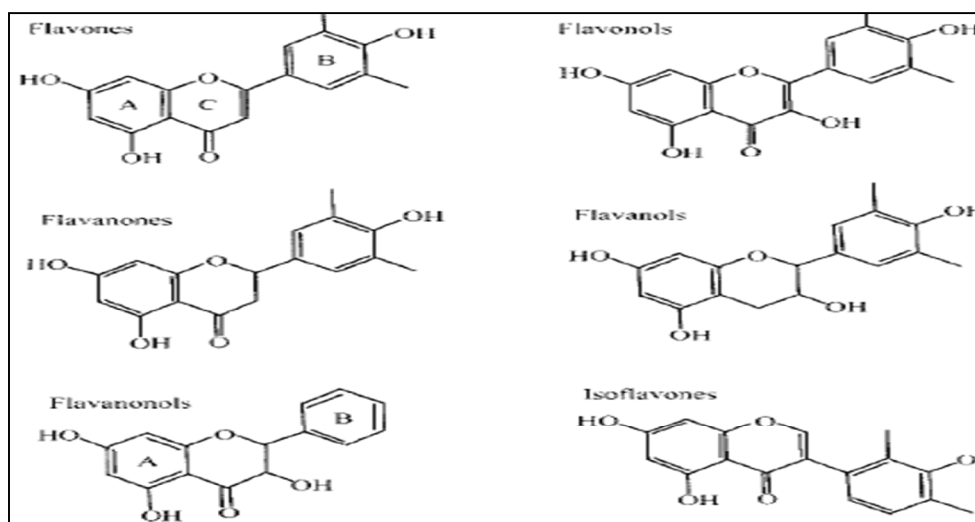


Figure n°18 : Structures chimiques des flavonoïdes (Balasundram et al., 2006).

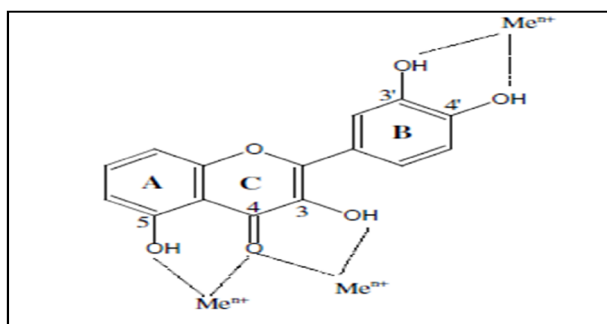


### ▪ Les mécanismes antioxydants des flavonoïdes

La classe des flavonoïdes est la plus proéminente et la plus importante des antioxydants de plante. Les activités antioxydantes des flavonoïdes sont multiples (Le et al., 2007) :

#### ↳ Chélation des métaux de transition

Les flavonoïdes inhibent la formation des radicaux libres par la chélation des métaux de transition  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mn}^{2+}$  (Zheng et Wang, 2001 ; Prior et al., 2003). La chélation se fait par les groupements carbonyles et hydroxyles des flavonoïdes (Saraf et al., 2007 ; Tabassum et al., 2010).



**Figure n°19:** Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques (Marfak, 2003).

#### ↳ Inhibition enzymatique

Les flavonoïdes sont des inhibiteurs enzymatiques à l'égard de l'aldose réductase, de la phospholipase et des enzymes de l'inflammation : la cyclooxygénase et la lipo-oxygénase (Ghedira, 2005), la xanthine oxydase et la phosphoinositide 3-kinase (Lin et al., 2002).

La xanthine oxydase catalyse l'oxydation de hypoxanthine et de la xanthine en l'acide urique. La xanthine oxydase utilise l'oxygène moléculaire comme accepteur final d'électrons, produisant ainsi le radical superoxyde et le peroxyde d'hydrogène (Sahgral et al., 2009).

La famille des flavonoïdes a montré une inhibition élevée de la XO (**Hoorn et al., 2002**). L'étude de la relation structure-activité a révélé plusieurs facteurs importants pour la liaison des flavonoïdes dans le site actif de la XO. Parmi ceux-ci, on cite :

-les oléfines en C2 et C3 qui maintiennent une structure plane des flavonoïdes sont essentielles pour une puissante activité inhibitrice de la XO. Les flavonoïdes non plans tels que la naringénine, n'ont exhibé aucune activité inhibitrice de la XO (**Lin et al., 2002**).

-Puisque l'apigénine a été le plus puissant inhibiteur parmi les flavonoïdes testés, la modélisation moléculaire a révélé que les groupements hydroxyles en C7 et C5 et le groupement carbonyle en C4 fournissent des liaisons hydrogènes favorables et des interactions électrostatiques entre les inhibiteurs et le site actif (**Lin et al., 2002**).

#### ↳ Piégeage des radicaux libres

Les flavonoïdes (Fl-OH) sont capables de réduire les radicaux libres oxydants par transfert d'hydrogènes attachés aux structures cycliques (**Heim et al., 2002**). Le radical flavonoxy (Fl-O<sup>•</sup>) peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable (figure n° 20) (**Marfak, 2003**).

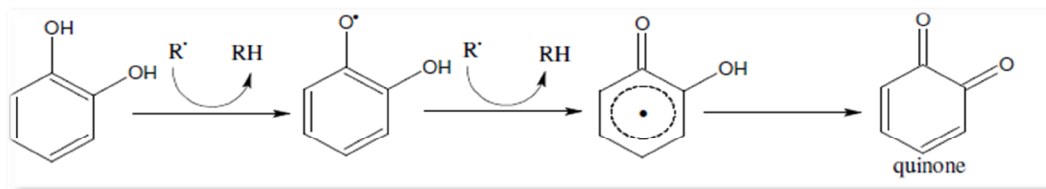


Figure n°20 : Piégeage des ERO par les flavonoïdes (**Marfak, 2003**).

*Partie*  
*expérimentale*

*MATÉRIELS*

*ET*

*MÉTHODES*

## I-Matériel et méthodes

### I- 1-Préparation du matériel végétal

Notre étude a porté sur une espèce de plante de la famille des Apiacées qui est *Thapsia garganica L.*

#### I-1-1-Récolte de la plante

Les deux parties de *Thapsia garganica L.* (feuilles et racines) (figure n°21) ont été récoltées au mois de Mars 2013 dans le village d'El-bir commune de Kendira, située à 45 km de la wilaya de Bejaïa, loin de tout impact de pollution.



**Figure n°21:** Photographies des feuilles et des racines de *Thapsia garganica L.*

#### I-1-2-Séchage et broyage

Après la récolte, les différentes parties de la plante ont été lavées à l'eau courante afin de les débarrasser des poussières et autres particules et conservées à l'ombre dans un endroit sec et aéré. Puis la plante a été séchée dans une étuve à 40°C pendant 2 jours avant l'extraction des composés phénoliques. Les racines ont été d'abord coupées en petits morceaux dans le but d'accélérer leur séchage.

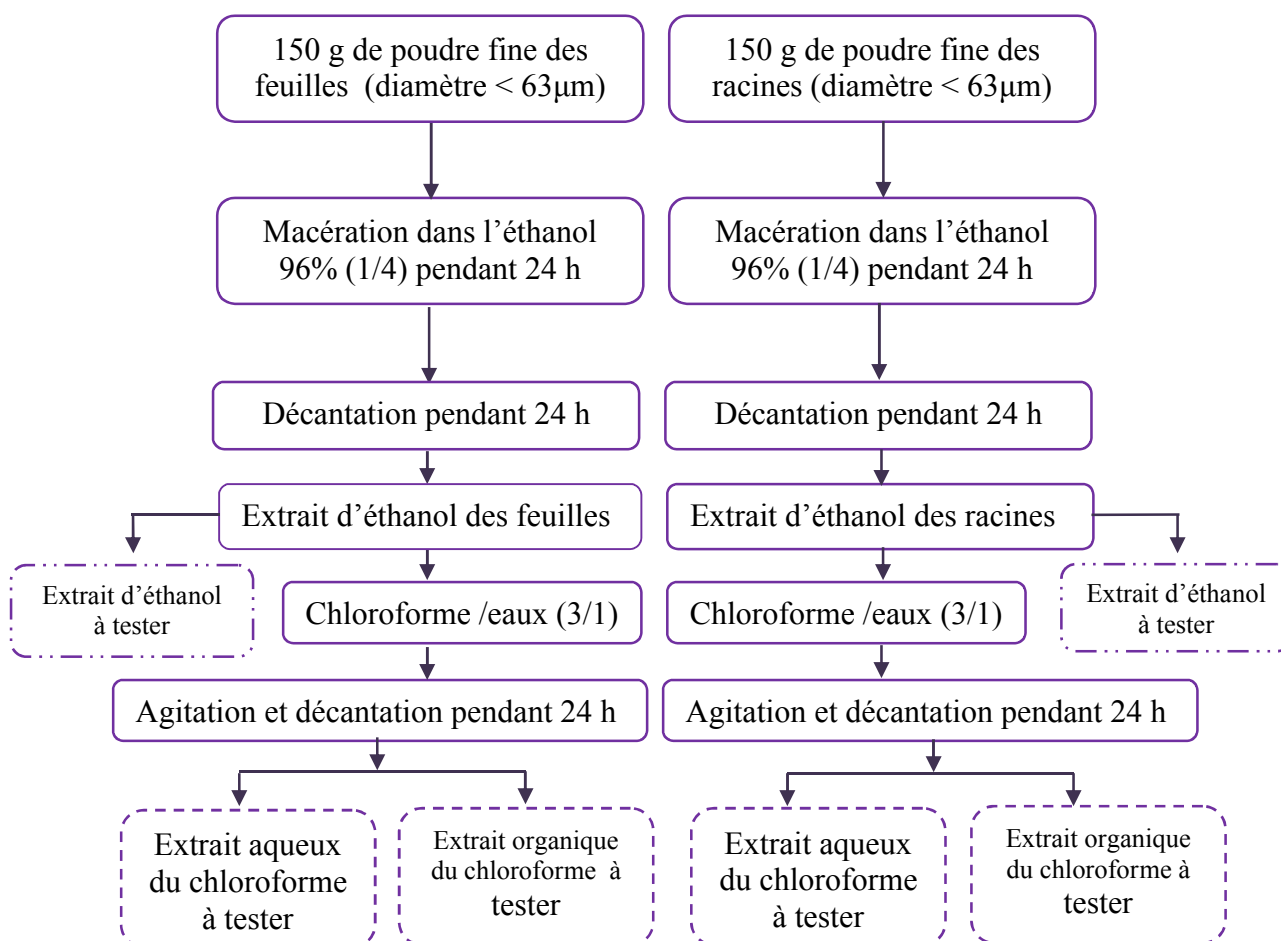
Le matériel végétal (feuilles et racines) destiné à l'extraction des composés phénoliques a été broyé, à l'aide d'un broyeur électrique, en une poudre fine pour permettre une meilleure extraction.

### I-1-3-Tamisage

La poudre obtenue suite au broyage a été tamisée à l'aide de deux tamis ayant des diamètres de 250 et de 63 $\mu$ m, pour récupérer à la fin une poudre très fine. La poudre a été ensuite conservée dans des bocaux en verre hermétiquement fermés et stockés à l'abri de la lumière.

### I-2-Extraction des composés phénoliques totaux

Le procédé d'extraction des polyphénols utilisé est celui décrit par **Chiang et al., (1994)** ayant subi quelques modifications, qui est schématisé dans la figure n°22. Le principe de cette méthode se base sur l'extraction sélective liquide-solide des composés phénoliques en utilisant trois solvants de différentes polarités : l'éthanol, l'eau et le chloroforme. Toutes les étapes d'extraction qui suivront ont été réalisées à températures ambiantes.



**Figure n°22** : protocole d'extraction des composés phénoliques totaux (**Chiang et al., 1994**).

### a) Calcul du rendement

Après l'extraction, six extraits ont été obtenus. Le taux d'extraction de chaque extrait sec a été calculé suivant la formule ci-dessous :

$$\text{Taux d'extraction} = [(P - P_0)/\text{poids de la poudre}] \times 100$$

Où :

**P<sub>0</sub>** : Poids vide du creuset.

**P** : poids après évaporation du solvant.

### I-3-Dosage des différents groupes de composés phénoliques :

Dans le but d'évaluer qualitativement et quantitativement le contenu en composés phénoliques des extraits des feuilles et des racines de *Thapsia garganica L.*, trois protocoles ont été suivis afin de doser les teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés.

Il est à noter que pour tous les dosages, l'extrait sec a été reconstitué dans du méthanol, et des blancs ont été préparés. Le dosage des différents groupes de composés phénoliques a été réalisé sur les extraits éthanoliques, organiques du chloroforme et aqueux du chloroforme des feuilles et des racines de *Thapsia garganica L.* dans les mêmes conditions.

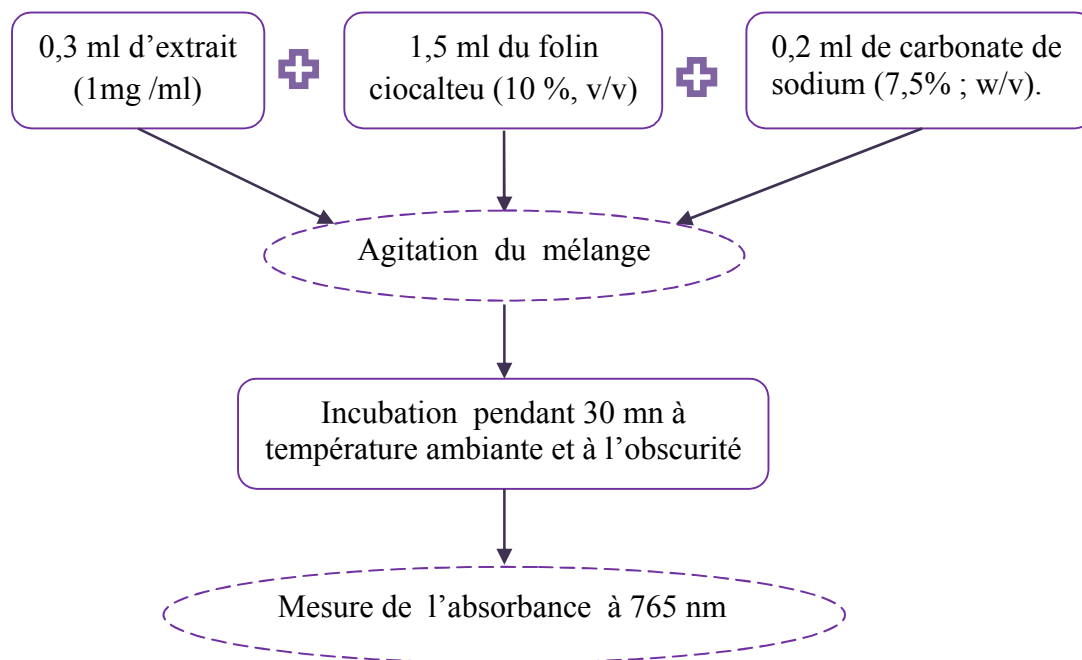
#### I-3-1-Dosage des phénols totaux

##### a) Principe

La quantification colorimétrique des composés phénoliques totaux a été déterminée selon la méthode décrite par **Yap et al., (2009)** avec quelques modifications. Le principe est basé sur l'utilisation du réactif de Folin ciocalteu, qui est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ). Ces derniers, lors de l'oxydation des phénols, sont réduits en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène, en présence d'une solution alcaline. La coloration produite, dont l'absorption maximale se situe à 765 nanomètres est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (**Boizot et Charpentier, 2006**).

## b) Mode opératoire

Le protocole utilisé par **Yap et al., 2009** pour le dosage des composés phénoliques totaux est schématisé dans la figure n°23.



**Figure n°23** : Protocole de dosage des composés phénoliques (**Yap et al., 2009**).

N.B. : un blanc a été préparé en remplaçant l'extrait par du méthanol.

## c) Expression des résultats

Les concentrations en composés phénoliques totaux des extraits sont déterminées en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue à différentes concentrations d'acide gallique dans le méthanol.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique par g d'extrait (mg EAG/g d'extrait).

### I-3-2-Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments universels des végétaux responsables de la coloration des fruits, des fleurs et parfois des feuilles.

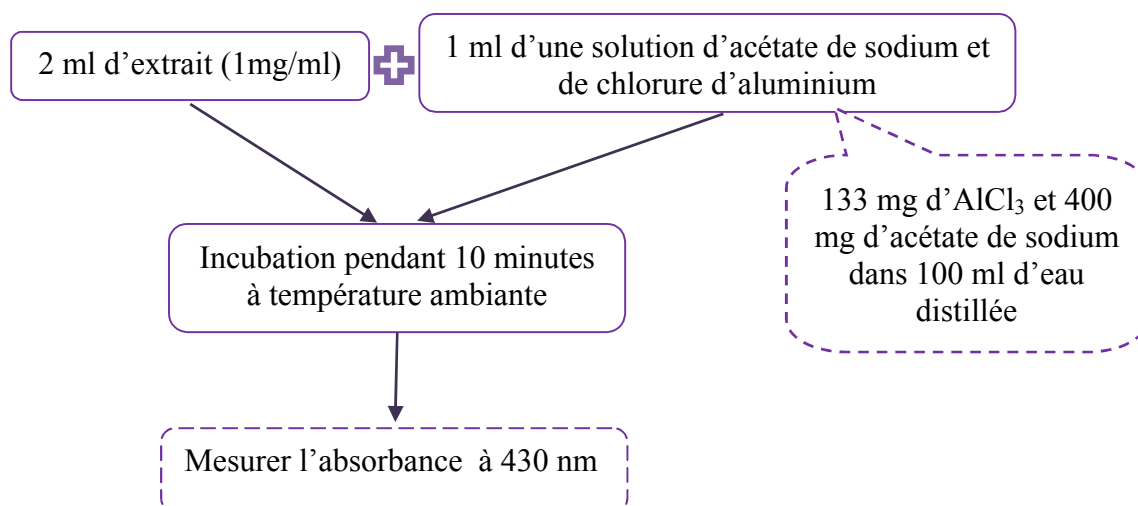


### a) Principe

Le dosage des flavonoïdes repose sur leur aptitude à chélater les métaux (fer et aluminium) forment ainsi des complexes jaunâtres, cette propriété est propre aux groupements hydroxyles des phénols flavonoïdes capables de donner un complexe en présence d'aluminium, utilisé dans notre protocole sous forme de chlorure d'aluminium (**Ribéreau-Gayon, 1968**).

### b) Mode opératoire

La teneur en flavonoïdes a été déterminée selon la méthode de **Mimica-Dukic, 1992 in (Abdou Bouba et al., 2010)**, ayant subi quelques modifications. Toutes les étapes du protocole sont schématisées dans la figure n° 24.



**Figure n° 24** : protocole de dosage des flavonoïdes (**Abdou Bouba et al., 2010**).

**N.B. :** Un blanc a été préparé pour chaque extrait en mélangeant 2 ml de solution d'extrait avec 1 ml d'eau distillée.

### c) Expression des résultats

Une courbe d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions, en utilisant la quercétine comme standard étalon, à différentes concentrations.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent quercétine par g de poids sec d'extrait (mg EQ/g d'extrait).

### I-3-3- dosage des proanthocyanidines

#### a) Principe

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode de la vanilline acidifiée. Cette technique est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins condensés en présence d'acide pour produire un complexe coloré mesuré à 500 nm. La réactivité de la vanilline avec les tanins n'implique que la première unité du polymère (figure n°25) (Nakatsubo *et al.*, 2002).

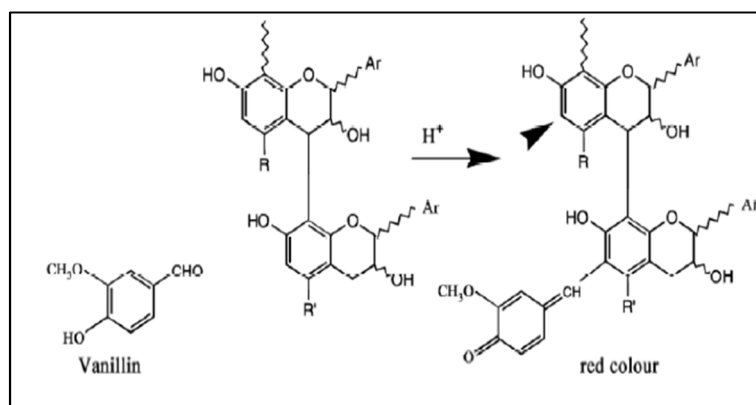


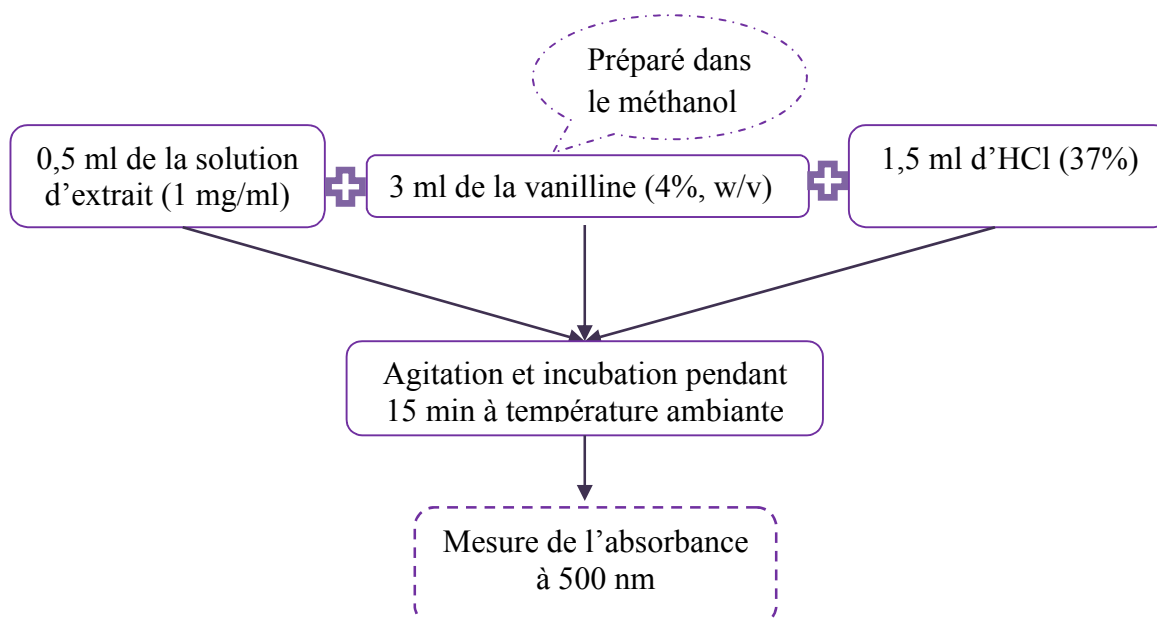
Figure n°25 : Mécanisme de la réaction de la vanilline avec les tanins condensés (Schofield *et al.*, 2001).

#### b) Mode opératoire

La teneur en tannins condensés (proanthocyanidines) est déterminée selon la méthode de Sun *et al.*, (1998) in Oyedemi et Afolayan (2011) avec quelques modifications. Le protocole utilisé est résumé dans la figure n° 26.

#### a) Expression des résultats

Les concentrations sont déterminées en se référant à la courbe d'étalonnage réalisée à différentes concentrations dans les mêmes conditions, en utilisant la catéchine comme standard et les concentrations ont été exprimés en mg équivalent catéchine par g d'extrait (mg EC/g d'extrait).



**Figure n° 26 :** protocole de dosage des proanthocyanidines (Oyedemi et Afolayan, 2011).

**N.B :** Un blanc d'extrait a été préparé pour chaque extraits, contenant 0,5ml de solution d'extrait, 3ml du méthanol et 1,5ml d'HCl.

#### I-4-Activité antioxydante des extraits

Pour toutes les activités, l'extrait sec est reconstitué dans du méthanol et préparé à différentes concentrations, et le blanc est préparé selon le même protocole que l'extrait sauf que ce dernier est remplacé par du méthanol.

Afin de mettre en évidence l'activité antioxydante des extraits de *Thapsia garganica* L., les trois tests suivants ont été réalisés.

##### I-4-1-Activité « scavenging » du radical DPPH

L'activité scavenging des radicaux libres des extraits a été mesurée en utilisant le radical libre stable DPPH $\cdot$  (C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>).

###### a) Principe

En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH $\cdot$  (2,2 diphenyl-1- picryl hydrazyl) de couleur violette (forme oxydée) se réduit en 2,2 Diphenyl-1- picryl hydrazine de couleur jaune (figure n° 27). L'intensité de la coloration, mesurée au spectrophotomètre à 517 nanomètres, est inversement proportionnelle à l'activité anti-radicalaire des composés dont on

souhaite déterminer l'activité (Molyneux, 2004).

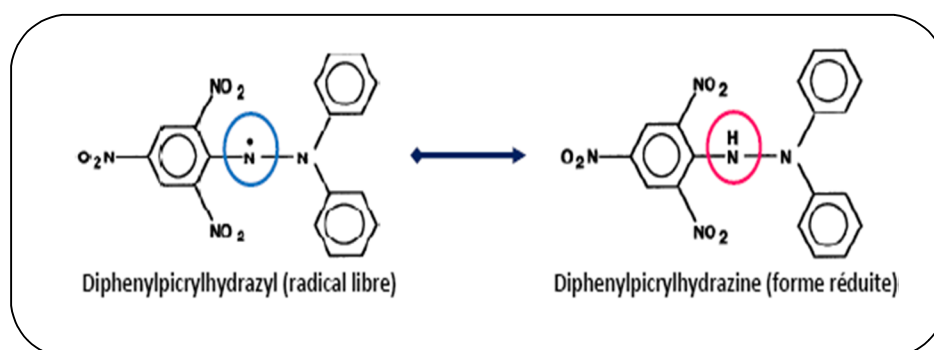


Figure n° 27 : Formes oxydée et réduite du DPPH (Molyneux, 2004).

### b) Mode opératoire

L'effet « scavenger » des extraits de *Thapsia garganica L.* vis à vis du radical DPPH a été mesuré selon le protocole de Hemalatha et al., (2010) représenté dans la figure n°28.

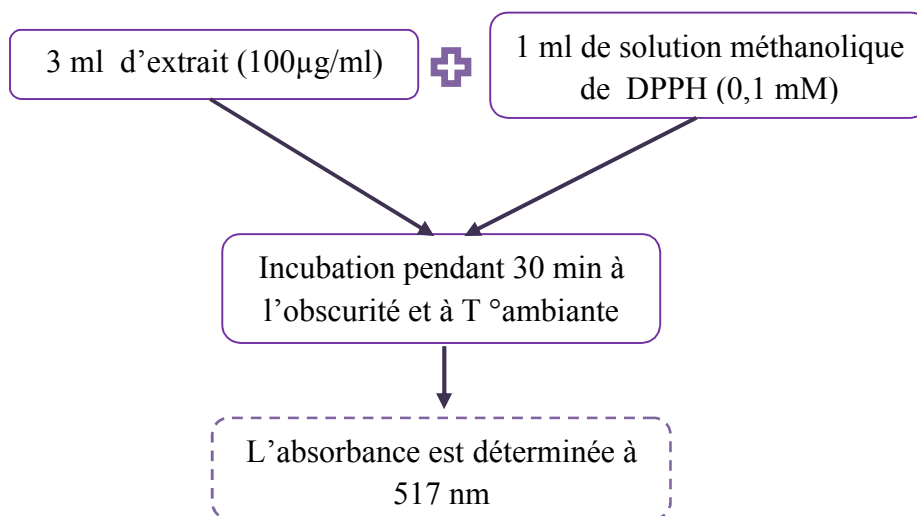


Figure n° 28: Protocole de l'activité scavenging du radical DPPH (Hemalatha et al., 2010).

### c) Expression des résultats

Le pourcentage de l'activité scavenging du radical DPPH a été calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ scavenging du radical DPPH} = (A_C - A_E / A_C) \times 100$$

Où :

$A_C$  : Absorbance du contrôle (DPPH+méthanol)

$A_E$  : Absorbance de l'échantillon [Absorbance du teste (échantillon +DPPH)- Absorbance du blanc du teste (échantillon+méthanol)]

#### I-4-2-Evaluation de l'activité anti-radicalaire du radical-cation $ABTS^{\bullet+}$

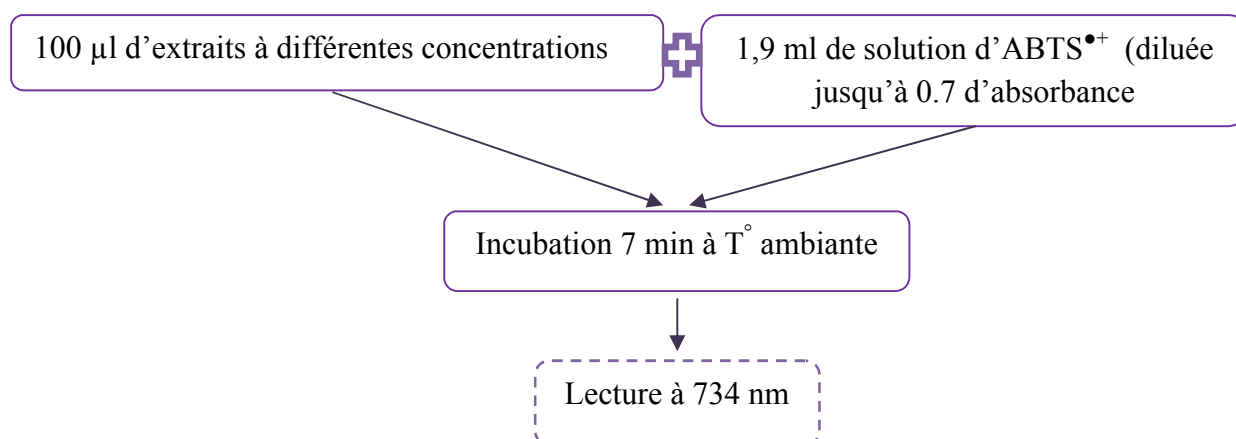
##### a) Principe

Cette méthode est basée sur la capacité des composés phénoliques à piéger le radical-cation  $ABTS^{\bullet+}$  (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique).

Le radical  $ABTS^{\bullet+}$  est formé par arrachement d'un électron à un atome d'azote de l'ABTS. En présence du Trolox (ou d'antioxydant donneur de  $H^{\bullet}$ ), le radical d'azote concerné piège un  $H^{\bullet}$ , conduisant à l' $ABTSH^+$ , ce qui entraîne la décoloration de la solution bleue (Djeridane et al., 2007).

##### b) Mode opératoire

Le protocole suivi pour cette étude est celui décrit par Le et al., 2007 ayant subi quelques modifications. Toutes les étapes du test sont résumées dans la figure n°29.



**Figure n°29 :** Protocole de l'évaluation de l'activité anti-radicalaire des extraits par l' $ABTS^{\bullet+}$  (Le et al., 2007).

### c) Expression des résultats

Le pourcentage d'activité scavenging du radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  a été calculé selon la l'équation suivante :

$$\text{Activité anti-radicalaire du radical-cation } \text{ABTS}^{\bullet+} = [(A_C - A_E / A_C] \times 100$$

Où :

$A_C$  : absorbance du contrôle.

$A_E$  : absorbance du test.

### I-4-3- Le pouvoir réducteur

#### a) Principe

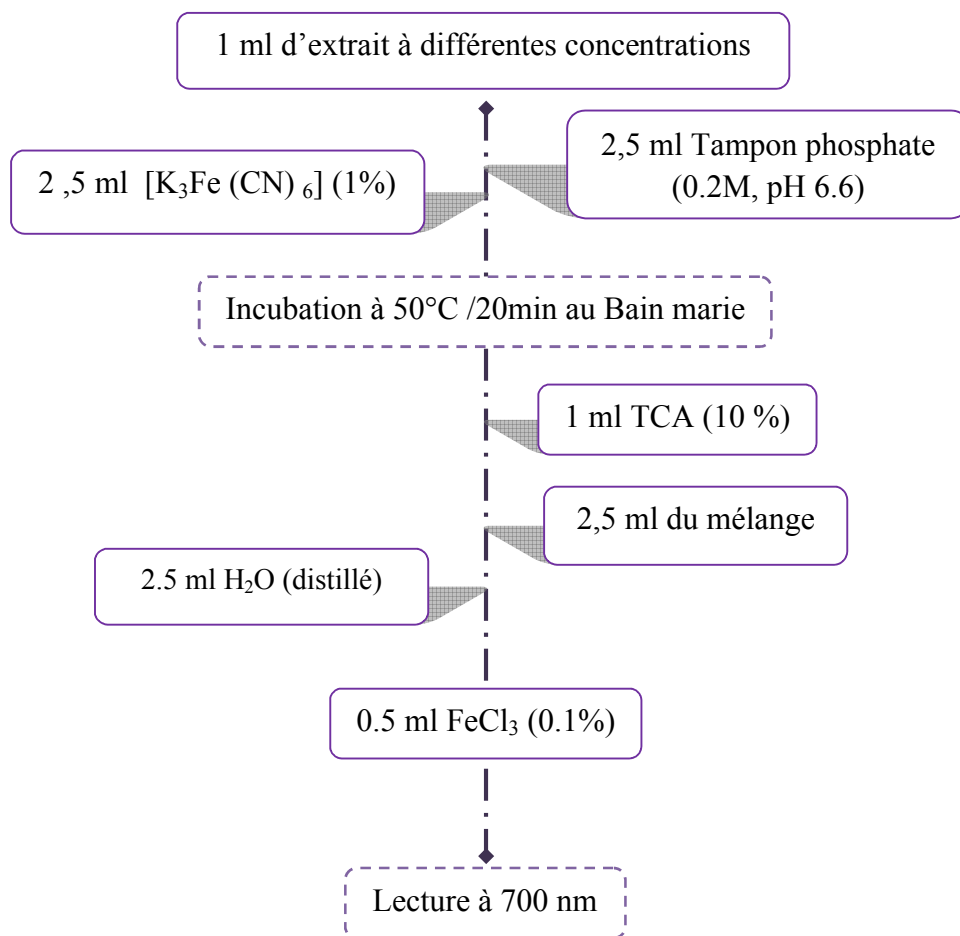
Le pouvoir réducteur est l'aptitude des antioxydants présents dans les extraits à réduire le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) du complexe ferricyanure en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ). La forme réduite de ce complexe donne une couleur « bleu prussien » dont l'intensité est proportionnelle au pouvoir réducteur de l'extrait (Bijoy *et al.*, 2008).

#### b) Mode opératoire

Le pouvoir réducteur des extraits de *Thapsia garganica L.* a été déterminé selon le protocole d'Oyaizu (1986) in Ogunlana et Ogunlana (2008) avec quelques modifications (figure n°30).

#### a) Expression des résultats

Pour chaque concentration, une absorbance est mesurée et les résultats sont représentés sous forme de graphique.



**Figure n°30 :** Protocole de l'évaluation du pouvoir réducteur des extraits de *Thapsia garganica L.* (Oyaizu, 1986).

Un blanc a été préparé en remplaçant l'extrait par du méthanol, et la BHA a été utilisée comme standard.

## I-5-Characterisation des extraits des feuilles et des racines de *Thapsia garganica L.*

### I-5-1-Fractionnement des extraits

La chromatographie sur couche mince (CCM) permet la séparation des composés phénoliques selon leur poids moléculaire et leur degré de solubilité, afin de pouvoir les caractériser.

Une plaque chromatographique est composée d'un support en verre ou d'aluminium sur lequel est posée une fine couche de silice qui constitue la phase stationnaire (Fournier, 2009).

Sur cette dernière ont été tracées deux lignes séparées au niveau des deux extrémités de la plaque chromatographique : l'une se trouve à 2,5 cm de l'extrémité basse, et l'autre à 3,5 cm de l'extrémité haute. Des échantillons de tous les extraits et des standards utilisés ont été déposés sur la ligne basse de la plaque chromatographique en respectant la même concentration (10 mg/ml) et le même volume (5  $\mu$ l), puis laissés sécher.

La deuxième étape consiste à introduire de façon verticale la plaque chromatographique dans une cuve de chromatographie préalablement saturée par un système de solvant approprié spécifique pour les extraits des feuilles et des racines de *Thapsia garganica L.*, celui-ci est composé de: acétone-toluène-acide formique (60 :60 :10, v/v).

Après l'élution, la plaque chromatographique a été séchée à l'air libre puis observée à la lumière du jour et sous UV. Finalement, une révélation à la vanilline sulfurique a été effectuée par une simple pulvérisation puis un chauffage à 100 °c pendant 10 mn. Les résultats ont été photographiés.

### **I-5-2-Caractérisation de l'activité antioxydante**

Dans le but de révéler l'activité antioxydante des fractions chromatographiques obtenues, deux autres plaques de CCM ont été préparées de la même manière, l'une a été pulvérisée par une solution méthanolique de DPPH à 0,5 mM et l'activité fut caractérisée par l'apparition de spots jaunâtres sur un fond violet (AKÉ et al., 2006), l'autre plaque a, quant à elle, été pulvérisée par une solution concentrée du radical-cation ABTS<sup>•+</sup> et l'activité fut caractérisée par l'apparition de spots décolorés sur un fond bleu vert. Les résultats finaux ont été photographiés.

### **I-6-Etude statistique**

Trois mesures ont été réalisées pour chaque échantillon analysé et les résultats ont été exprimés sous la forme : moyenne  $\pm$  écartype. Des comparaisons statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel Anova. Les différences ont été considérées d'être significatives à  $\alpha = 0,05$ . Les valeurs des IC50 ont été calculées en utilisant le logiciel Origine 8.



*RÉSULTATS*  
*ET*  
*DISCUSSION*

## II-1-Rendement de l'extraction

L'extraction des polyphénols à partir des plantes est influencée par la méthode d'extraction, la nature du solvant, le diamètre des particules de l'échantillon, la durée et les conditions de stockage ainsi que la présence de substances interférentes (Naczki et Shahidi, 2004).

Dans notre travail, afin d'obtenir des combinaisons phénoliques distinctes, une extraction liquide-solide sélective a été réalisée en utilisant trois solvants de différentes polarité, à savoir, deux solvants polaires: l'éthanol et l'eau et un solvant apolaire : le chloroforme. Commencer l'extraction par l'éthanol est intéressant car ce dernier représente un solvant permettant la dissolution de la majorité des composés phénoliques (Cowan, 1999).

En outre, dans le but d'augmenter le rendement d'extraction, la poudre très fine (diamètre < 63µm) a été utilisée pour les feuilles et les racines afin d'élargir la surface d'échange entre le matériel végétale et le solvant d'extraction.

Une fois les extraits secs, le calcul du taux d'extraction pour chaque extrait a donné les résultats suivants (tableau n° V) :

**Tableau n° V** : Les pourcentages d'extraction pour chaque extrait de *Thapsia garganica L.*

Extraits	Taux d'extraction
Extrait éthanolique des feuilles	4,15%
Extrait du chloroforme des feuilles	38,97%
Extrait aqueux du chloroforme des feuilles	31,78%
Extrait éthanolique des racines	4,93%
Extrait du chloroforme des racines	29,39%
Extrait aqueux du chloroforme des racines	17,73%

Bien que les feuilles soient plus riches en composés phénoliques que les racines (figure n°31), nous remarquons que l'extrait éthanolique des racines a donné un taux d'extraction légèrement supérieur à celui de l'extrait éthanolique des feuilles, cela suggérerait la richesse des

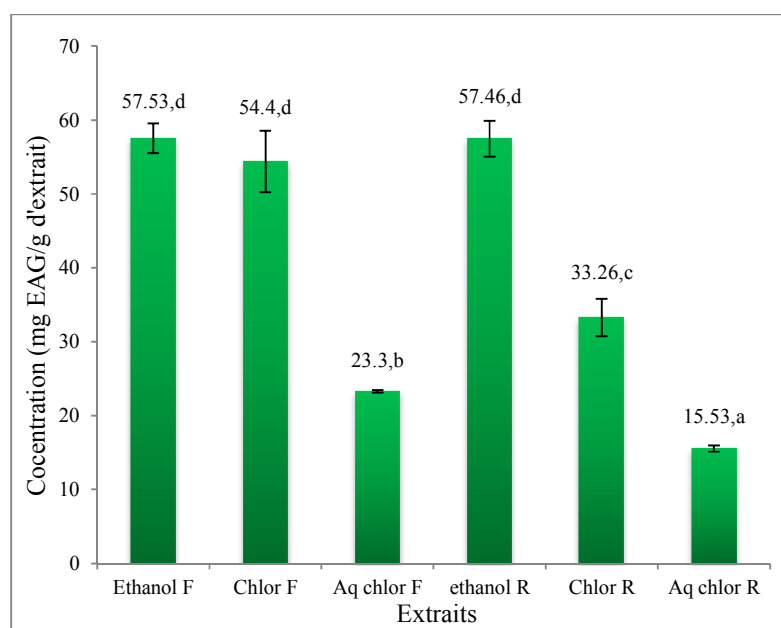
racines en composés photochimiques autres que les composés phénoliques (lipides, gommés...). Effectivement, lors de la deuxième étape d'extraction des racines (chloroforme et eau), des lipides et des gommés ont été récupérés dans l'interphase.

Nous constatons également que c'est l'extrait organique du chloroforme qui a donné le taux d'extraction le plus élevé comparé à l'extrait aqueux du chloroforme. Cela pourrait supposer la richesse des feuilles et des racines de *Thapsia garganica L.* en composés de polarité réduite.

## II-2- Dosage des composés phénoliques

### II-2-1-Dosage des phénols totaux

Les teneurs en phénols totaux des extraits des feuilles et des racines de *Thapsia garganica L.*, exprimées en mg équivalent acide gallique /g d'extrait, sont représentées dans la figure ci-dessous :



**Figure n°31** : Représentation graphique des teneurs en phénols totaux des extraits des feuilles et des racines de *Thapsia garganica L.*

Une vue d'ensemble de la représentation graphique nous laisse remarquer que les teneurs en phénols totaux de *Thapsia garganica L.* sont comprises entre  $57.53 \pm 2.01$  mg équivalent acide

gallique/g d'extrait (éthanol des feuilles) et  $15.53 \pm 0.41$  mg équivalent acide gallique /g d'extrait (aqueux du chloroforme de racines).

L'étude de **Rached et al., (2010)**, a montré qu'un extrait des feuilles de *Thapsia garganica* L. d'origine algérienne a laissé apparaître une teneur en phénols totaux de  $47.64 \pm 1.43$  mg équivalent acide gallique/g d'extrait qui est voisine de celle de notre extrait du chloroforme des feuilles qui est de  $54,4 \pm 4,15$  mg équivalent acide gallique /g d'extrait.

Une autre étude a été effectuée par **Djeridane et al., 2006**, ces derniers ont trouvé des valeurs très inférieures à nos résultats soient seulement de  $7,63 \pm 0,61$  mg EAG/g d'extrait sec et cela en utilisant l'éthanol 70%, cette différence peut ainsi être expliquée par :

- ✚ La méthode d'extraction : utilisation d'une solution éthanolique diluée (70%).
- ✚ La région de la récolte : **Djeridane et al., 2006** ont récolté les plantes à partir de différents endroits autour de la ville de Laghouat (sahara).
- ✚ La période de récolte : les plantes ont été cueillies en juin pour **Djeridane et al., 2006**
- ✚ Enfin , **Djeridane et al., 2006** ont effectué une delipidation de l'extrait de manière à ne doser que les polyphénols, car le follin-ciocalteu n'est pas spécifique qu'aux polyphénols, mais beaucoup de composés peuvent réagir avec ce dernier et donner un taux apparent élevé en polyphénols (**tawaha et al., 2007**).

La teneur la plus élevée en phénols totaux des extraits des feuilles et des racines a été marquée par les extraits éthanoliques respectivement de  $57.53 \pm 2.01$  et  $57.46 \pm 2.46$  (mg EAG/g d'extrait); ceci serait évident étant donné que ce sont les extraits bruts et de ce fait ils constituent la source initiale du reste des extraits. En d'autres termes, ce sont les précurseurs des autres extraits de plantes.

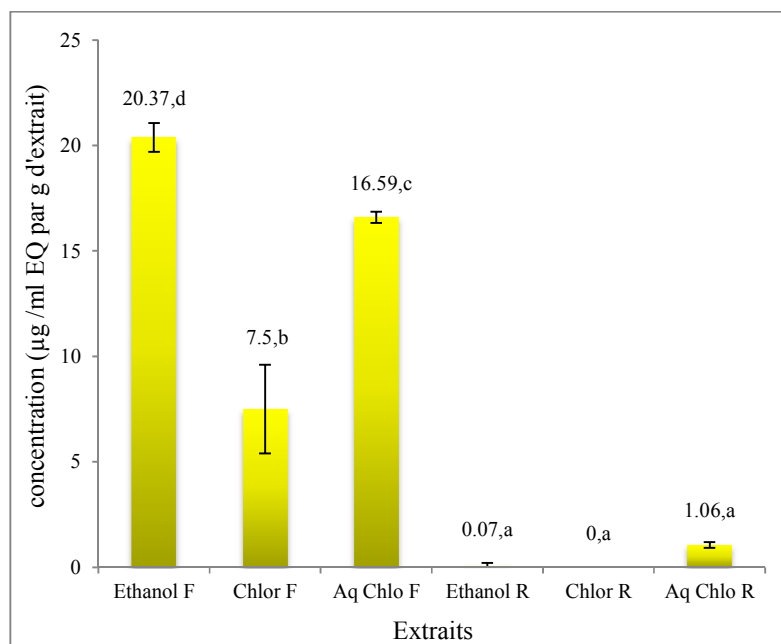
Il est à noter également que les concentrations en phénol totaux des extraits organiques du chloroforme des deux parties de la plante ont été plus élevées par rapport aux extraits aqueux du chloroforme ; cela s'expliquerait par le fait que les extraits organiques seraient riches en tannins hydrolysables qui constituent des polymères de nature polycyclique qui seraient donc légèrement hydrophobes se solubiliseraient ainsi dans les solvants organiques apolaires (chloroforme).

Finalement, nous constatons que les feuilles de *Thapsia garganica L.* sont plus riches en composés phénoliques que les racines. On peut expliquer ce résultat par le fait que les feuilles sont le siège principal de la synthèse de ces métabolites (Brzowska et Hanower, 1976 ; Del Rio et al., 2003), étant donné leur rôle protecteur contre les herbivores et les rayons ultraviolets (Borchardt et al., 2008).

### I-2-2-Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments naturels largement répandus chez les plantes. Ils protègent l'organisme contre les dommages oxydatifs tels que les rayons ultraviolets, la pollution de l'environnement, les produits chimiques, etc. (Martínez-Flórez et al., 2002).

La figure n°32 illustre les teneurs en flavonoïdes des extraits des feuilles et des racines de *Thapsia garganica L.* exprimées en mg équivalent quercétine /g d'extrait :



**Figure n°32:** Teneurs en flavonoïdes des extraits de racines et de feuilles de *Thapsia garganica L.*

On constate, d'après les résultats obtenus, que le taux en flavonoïdes est appréciable pour l'extrait éthanolique des feuilles avec un maximum de  $20.35 \pm 0.68$  mg EQ/g d'extrait, par contre les racines en sont relativement pauvres avec une teneur maximal qui est de  $1.06 \pm 0.13$  mg EQ/g marquée par l'extrait aqueux de chloroforme. Une étude réalisée par **Djeridane et al., 2007** a montré que 98% des polyphénols totaux de la partie aierienne de *Thapsia garganica L.* sont des flavonoïdes, ceci serait évident étant donné que c'est la partie aierienne qui joue un rôle important dans la protection contre les rayonnements solaires (**Ryan et al., 2002**) et que ce groupe de composés phénoliques intervient dans la coloration des feuilles et des pétales des fleurs (**Havsteen, 2002 ; Gervaise, 2004**).

Comparés aux résultats obtenus par **Djeridane et al., en 2006 et 2010** nos résultats sont largement supérieure. En effet, lors de ces études les flavonoïdes représentaient  $4,04 \pm 0,42$  mg équivalent de Rutine par g d'extrait des parties aériennes en utilisant comme solvant d'extraction de l'éthanol à 70%, alors que nos résultats révèlent des valeurs de  $20.35 \pm 0.68$  mg EQ par g d'extrait éthanolique des feuilles.

En outre, une autre étude réalisée par **Rached et al., 2010**, a montré qu'un extrait des feuilles de *Thapsia garganica L.* d'origine algérienne a laissé apparaître une teneur en flavonoïdes de  $18.13 \pm 0.47$  mg équivalent catéchine /g d'extrait qui est proche de celle obtenue pour l'extrait éthanolique et aqueux du chloroforme des feuilles dans notre étude.

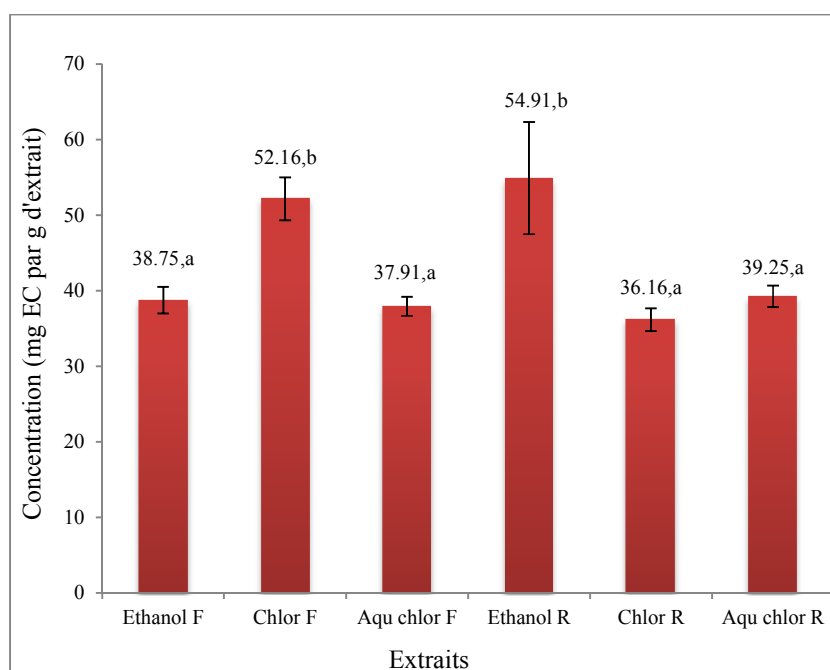
Il est à noter que la teneur en flavonoïdes de l'extrait éthanolique est supérieure à celle de l'extrait du chloroforme des feuilles. Cela serait dû au fait qu'il soit l'extrait brut donc il contiendrait la totalité des composés phénoliques. Néanmoins, concernant les racines, la concentration en flavonoïdes de l'extrait éthanolique est inférieure à celle de l'extrait aqueux du chloroforme. Cela serait aussi dû au fait que la présence de plusieurs composés dans l'extrait éthanolique brut engendrerai un encombrement stérique et empêcherai ainsi la formation du complexe entre les groupements hydroxyles des flavonoïdes et le  $Al^{+3}$  du chlorure d'aluminium d'où la diminution de l'absorbance à 430 nm.

Il est à noter également que les extraits aqueux du chloroforme sont riches par apport aux extraits organiques étant donné que les flavonoïdes sont de petites molécules hydrosolubles dont

les groupements hydroxyles facilitent leur solubilisation dans les solvants polaires (**Curtay et Robin, 2000**).

### II-2-3-Dosage des proanthocyanidine

Le contenu en tanins condensés des extraits des feuilles et des racines de *Thapsia garganica L.*, exprimé en mg équivalent catéchine /g d'extrait est représenté dans l'histogramme ci-dessous:



**Figure n°33 :** Représentation graphique des quantités en proanthocyanidines dans les différents extraits des feuilles et des racines de *Thapsia garganica L.*

Cette représentation graphique (Figure n°33) nous laisse déduire que notre plante reflète un taux satisfaisant en proanthocyanidines, ainsi les varient entre  $54,91 \pm 7,4$  et  $36,14 \pm 1,5$  mg équivalent catéchine par g d'extrait. Cette teneur importante pourrait être associée au rôle des tanins dans la protection des plantes contre les organismes nuisibles (**Kathiresan, 2003**).

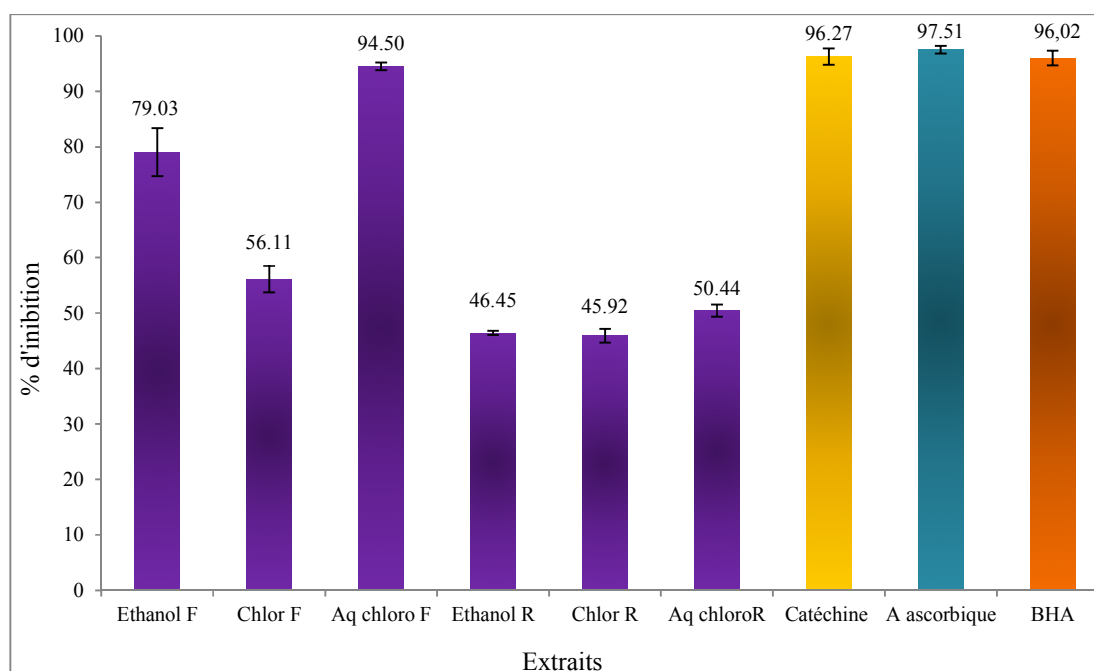
Nous remarquons également que l'extrait organique du chloroforme des feuilles a donné une teneur en proanthocyanidine ( $52.16 \pm 2.82$  mg EC/g d'extrait) qui est plus élevé par rapport à celle de l'extrait éthanolique ( $38.75 \pm 1.76$  mg EC/g d'extrait).

Cela pourrait être du au fait que le réactif révélateur (la vanilline) réagit uniquement avec la première unité du polymère de proanthocyanidines (Ba et al., 2010) et également cause de l'encombrement stérique engendré par la structure volumineuse des tannins condensés des feuilles dans l'extrait brut, contrairement à ce qui l'en est au niveau des racines où c'est l'extrait aqueux ( $39.25 \pm 1.41$  mg EC/ g d'extrait) qui a été le plus fortement concentré par rapport à l'extrait organique ( $37.91 \pm 1.28$  mg EC/ g d'extrait) car les oligomères de proanthocyanidines se solubiliserait mieux dans l'eau grâce a leur richesse en groupements hydroxyles. Comme conséquence a cela nos notons que l'extrait éthanolique des racines donné plus que les extraits décollons de l'extrait éthanolique.

### II-3-Activités antioxydantes de *Thapsia garganica L.*

#### II-3-1-Activité scavenging du radical DPPH

Les résultats de l'activité anti-radicalaire, vis-à-vis du radical DPPH, des standards et des extraits sont exprimés en pourcentage d'inhibition et représentés dans la figure ci-dessous :



**Figure n°34:** Activité scavenging du radical DPPH par les extraits de *Thapsia garganica L.*



Les standards employés présentent des pourcentages scavenging allant de 96.27%  $\pm$  1.46 % (catéchine) 97.51%  $\pm$  0.66% (A ascorbique) à 96.02%  $\pm$  1.33% (BHA) à 100 $\mu$ g/ml.

D'après les résultats obtenus, nous constatons que tous les extraits de *Thapsia garganica L.* ont exhibé une très forte activité scavenging du radical DPPH comparativement aux pourcentages d'inhibition montrés par les standards utilisés. En effet, **Rached et al., (2010)** on montré que les extraits des feuilles de *Thapsia garganica L.* ont exhibé une inhibition positive du radical DPPH.

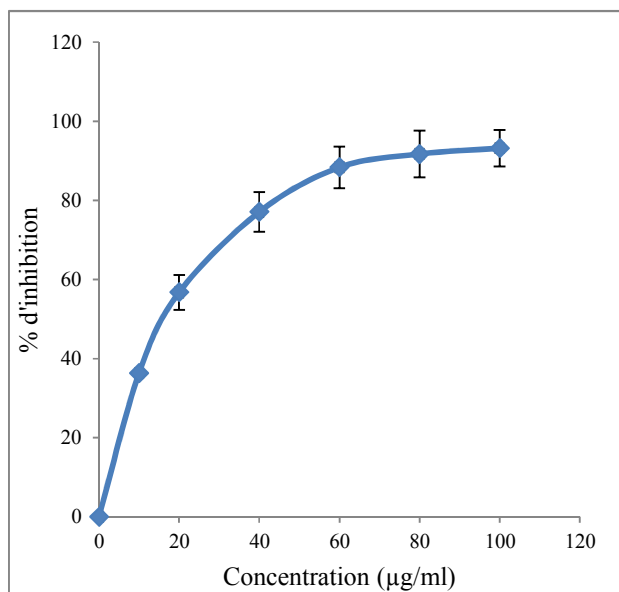
On constate également, que les extraits aqueux du chloroforme de *Thapsia garganica L.* sont les plus efficaces par rapport aux extraits organiques du chloroforme pour les feuilles et les racines proportionnellement à leurs concentrations en flavonoïdes qui constituent de puissants agents antioxydants (**Harvsteen, 2002**), mais il ne faut pas négliger le pourcentage d'inhibition des extraits organiques qui sont riches en proanthocyanidines qui exercent une activité scavenging moindre que celle des flavonoïdes. On remarque aussi que les feuilles présentent des pourcentages d'inhibition supérieurs à ceux des racines, puisqu'elles renferment des teneurs en flavonoïdes plus importantes. Par ailleurs, il existe une corrélation positive entre les teneurs en flavonoïdes et les pourcentages scavenging du radical DPPH (R=0.931). Les extraits éthanoliques ont exhibé des pourcentages d'inhibition plus faibles que les extraits descendants; ceci serait dû à l'encombrement stérique qui existe dans ces extraits bruts.

#### ❖ Détermination des IC<sub>50</sub>

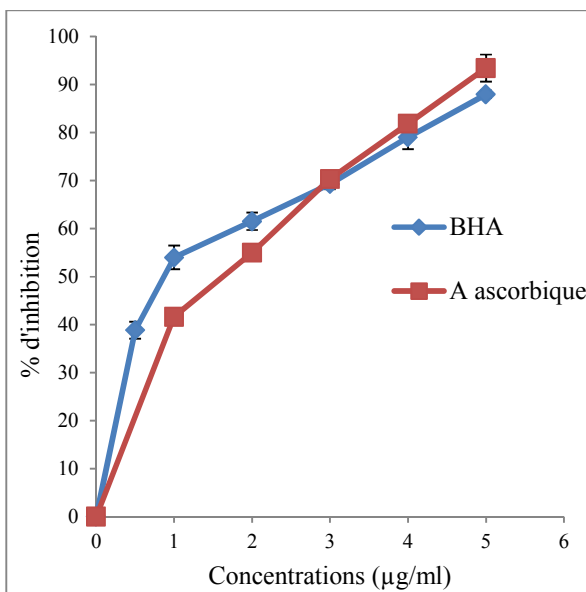
Le paramètre IC<sub>50</sub> (Concentration inhibitrice à 50%) ou EC<sub>50</sub> (Efficient concentration) est défini comme étant la concentration du substrat qui entraîne une perte de 50% de l'activité. Les IC<sub>50</sub> de l'activité du DPPH sont inversement proportionnelles à l'effet scavenger dont les valeurs les plus faibles reflètent un effet anti-radicalaire important (**Molyneux, 2004 ; Vilano et al., 2007**).

D'après les résultats obtenus dans la figure n°35 qui présente l'activité anti-radicalaire, vis-à-vis du radical DPPH, de l'extrait aqueux du chloroforme des feuilles, on déduit que l'activité anti-radicalaire augmente en fonction de la concentration de l'extrait, plus la concentration est élevée plus le pourcentage d'inhibition augmente.

Dans le cas de notre échantillon, l' $IC_{50}=16,41\mu\text{g/ml}$  et est supérieure à celles des standards utilisés : la BHA et l'acide ascorbique qui ont respectivement des  $IC_{50}$  égales à  $0,98\mu\text{g/ml}$  et  $IC_{50}=1,61\mu\text{g/ml}$  (figure n°36). Notre résultat est en accord avec celui retrouvé par **Djeridane et al., 2010** qui est de  $17,06\pm 0,02\mu\text{g/ml}$ .



**Figure n°35** : Activité scavenging du radical DPPH à différentes concentrations de l'extrait aqueux du chloroforme des feuilles de *Thapsia garganica L.*

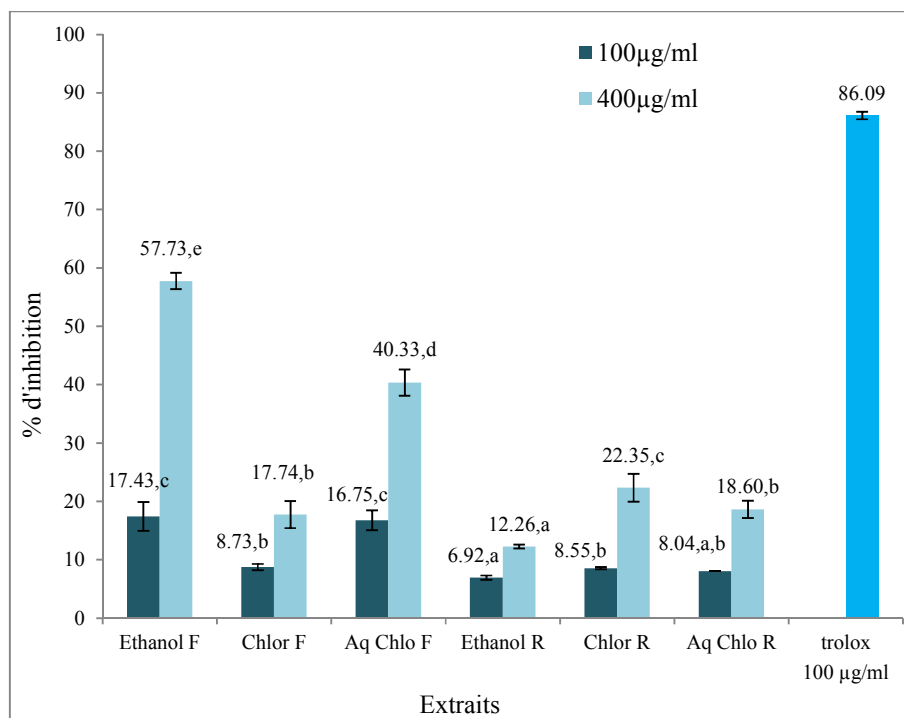


**Figure n°36** : Activité scavenging de radical DPPH des différentes concentrations de l'acide ascorbique et de la BHA.

### II-3-2-Activité scavenging du radical $ABTS^{\bullet+}$

Les résultats de l'activité anti-radicalaire, vis-à-vis du radical  $ABTS^{\bullet+}$ , du standard et des extraits sont exprimés en pourcentage d'inhibition et représentés dans la figure n°37.

D'après nos résultats, nous constatons que tous les extraits de *Thapsia garganica L.* ont dévoilé une faible activité scavenging du radical  $ABTS^{\bullet+}$ , allant de  $6,92\% \pm 0,35\%$  à  $17,43\% \pm 2,48\%$  comparativement au standard utilisé, le trolox, qui a donné un pourcentage d'inhibition de  $86,53\% \pm 0,61$  (à  $100\mu\text{g/ml}$ ), par contre à  $400\mu\text{g/ml}$  le pourcentage d'inhibition varie de  $12,26\% \pm 0,32\%$  à  $57,73\% \pm 1,38\%$ . Une étude menée par **Djeridane et al., 2006** a montré que le pourcentage d'inhibition est de  $15,30\text{ m mol TEAC/g}$  de matière sèche.



**Figure n°37** : Activité inhibitrice du radical  $ABTS^{\bullet+}$  par les extraits de *Thapsia garganica L.*

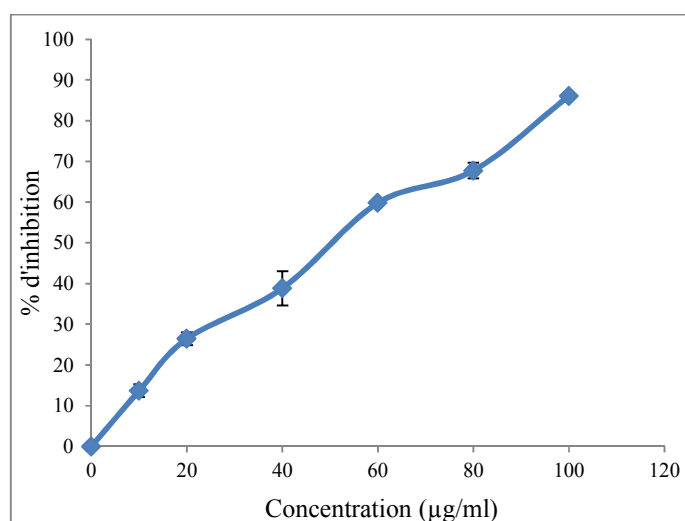
Concernant les feuilles, c'est l'extrait éthanolique qui a montré le pourcentage d'inhibition le plus élevé étant donné que c'est l'extrait brut donc il contient la totalité des phénols totaux. En outre, c'est l'extrait aqueux du chloroforme qui a donné plus que l'extrait organique vu sa richesse en flavonoïdes. De la même manière, ce sont les feuilles qui ont été plus fortes que les racines. Effectivement, ces résultats sont d'autant plus confirmés par l'existence d'une corrélation positive entre les teneurs en flavonoïdes et les pourcentages scavenging du radical  $ABTS^{\bullet+}$  ( $R=0.917$ ).

En revanche, l'extrait éthanolique des racines s'est montré moins actif étant donné la complexité de sa composition et par conséquent, l'engendrement d'encombrements stériques. En ce qui concerne les extraits des racines, c'est l'extrait organique du chloroforme qui s'est montré le plus actif en comparaison à l'extrait aqueux correspondant.

On peut donc en conclure que l'activité inhibitrice du radical  $ABTS^{\bullet+}$  au niveau des racines est dépendante de la teneur en phénols totaux.

#### ❖ Détermination des $IC_{50}$

La valeur de l' $IC_{50}$  obtenue avec notre standard est homogène avec le pourcentage scavenging des différentes concentrations (**figure n°38**). Ainsi, le trolox a montré une valeur de l' $IC_{50} = 50,18 \mu\text{g/ml}$ .



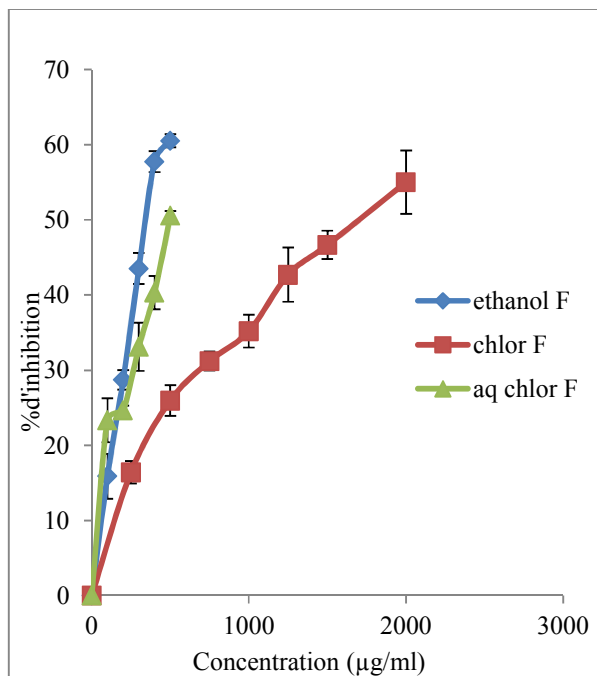
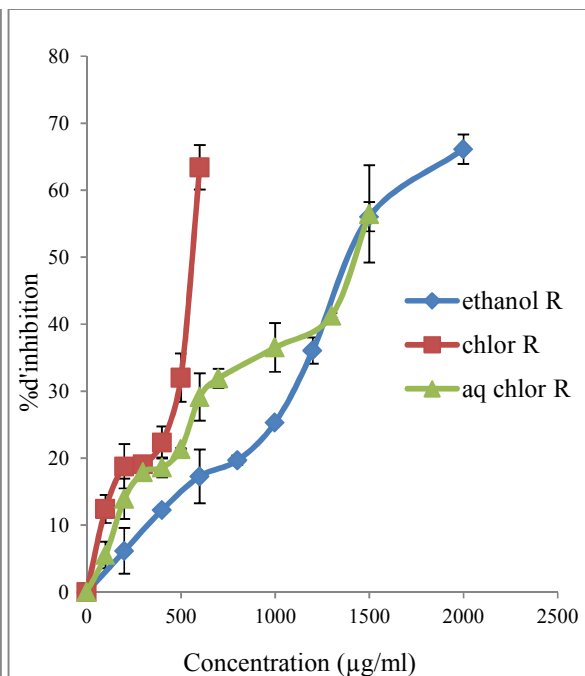
**Figure n°38** : Activité scavenging du radical ABTS par l'antioxydant de synthèse (Trolox).

Pour tous les extraits, nous remarquons que la variation de l'activité scavenging du radical  $ABTS^{\bullet+}$  est dépendante de la concentration (figure n° 39 et n°40), avec des  $IC_{50}$  indiquées dans le tableau n° VI. A partir de ce dernier nous déduisons que les feuilles présentent des  $IC_{50}$  plus faibles que celles des racines, donc une meilleure activité est observée dans le cas des extraits des feuilles comparativement aux racines.

**Tableau n° VI :** les valeurs des  $IC_{50}$  des différents extraits de *Thapsia garganica L.*

Extraits	$IC_{50}$ en $\mu\text{g/ml}$
Ethanolique feuilles	346,23
Organique du chloroforme feuilles	1692,78
Aqueux du chloroforme feuilles	490,33
Ethanolique racines	1460,98
Organique du chloroforme racines	560,72
Aqueux du chloroforme racines	1439,63

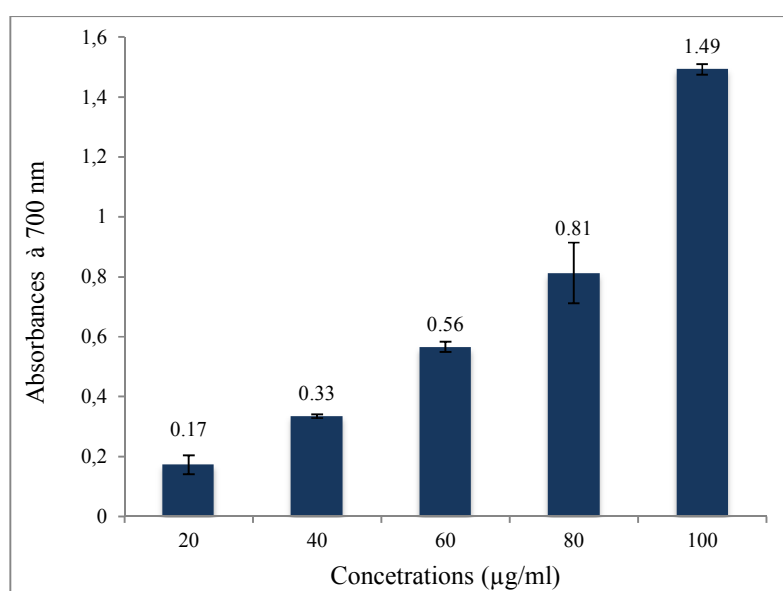
Finalement, nous constatons que l'activité de nos extraits reste largement inférieure à celle du standard utilisé. Ainsi, le potentiel anti-radicalaire se classe dans l'ordre décroissant suivant : trolox < Ethanolique feuilles < Aqueux du chloroforme feuilles < Organique du chloroforme racines < Aqueux du chloroforme racines < Ethanolique racines < Organique du chloroforme feuilles.

**Figure n°39 :** Activité scavenging du radical ABTS à différentes concentrations des extraits des feuilles.**Figure n°40 :** Activité scavenging du radical ABTS à différentes concentrations des l'extraits des racines.

### II-3-3-Le pouvoir réducteur

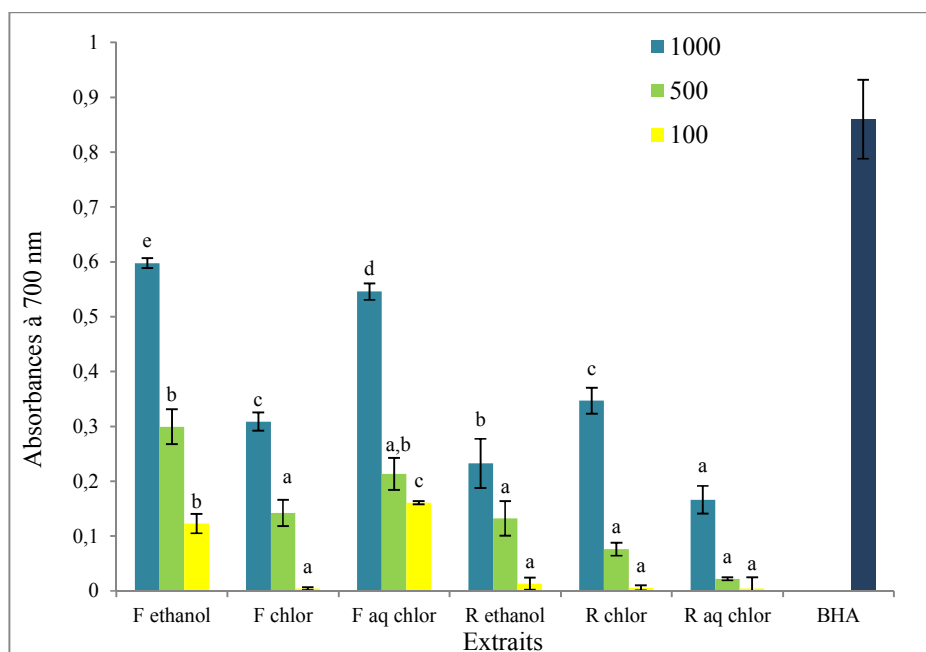
Le pouvoir réducteur est la capacité d'une substance à transférer un électron ou à donner un atome d'hydrogène. Dans cet essai, nous mesurons ce potentiel réducteur à travers la réduction du complexe  $\text{Fe}^{3+}$  du ferricyanure de potassium en forme ferreuse  $\text{Fe}^{2+}$  qui se traduit par une coloration verte-bleuâtre.

Les figures n° 41 et n° 42 montrent les graphes du pouvoir réducteur de l'antioxydant de synthèse et de nos extraits respectivement.



**Figure n°41** : pouvoir réducteur de l'antioxydant de synthèse la BHA.

D'après les résultats représentés dans les figures 41 et 42, nous pouvons constater en premier lieu que le pouvoir réducteur est proportionnel à la concentration (antioxydant de synthèse et extraits de *Thapsia garganica L.*).



**Figure n°42** : pouvoir réducteur des extraits des feuilles et des racines de *Thapsia garganica L.*

En revanche, nous pouvons noter qu'il existe une grande différence entre l'activité du standard utilisé et celle des échantillons testés. En effet, pour une concentration de 100 µg/ml, l'absorbance donnée par le standard est de  $1.49 \pm 0.01$ , alors que les absorbances de nos échantillons varient de  $(0.166 \pm 0.02)$  à  $(0.597 \pm 0.009)$  à une concentration dix fois plus élevée, soit de 1000 µg/ml. Cette différence d'activité est probablement due au degré de pureté des échantillons utilisés, le standard étant un composé pur de synthèse et les échantillons des extraits bruts non purifiés.

Pour nos échantillons, on remarque que les extraits des feuilles présentent une meilleure activité réductrice que les extraits des racines, cela est en accord direct avec leur teneur élevée en phénols totaux et en flavonoïdes.

Concernant les feuilles, c'est l'extrait éthanolique qui a exhibé une meilleure activité réductrice vu le taux important des phénols totaux riches en groupements hydroxyles donneurs d'électrons. Par ailleurs, l'extrait aqueux du chloroforme présente une absorbance plus élevée que l'extrait organique du chloroforme, étant donné qu'il possède la teneur la plus élevée en

flavonoïdes; cela confirme l'existence de la corrélation positive entre la teneur en flavonoïdes et le pouvoir réducteur ( $R=0.908$ ).

En outre, l'extrait organique du chloroforme des racines montre une absorbance de  $0.347\pm 0.023$  qui est la plus grande par rapport aux deux autres extraits, cela semble évident quant à la corrélation positive existante entre la teneur en phénols totaux et le pouvoir réducteur ( $R=0.517$ ).

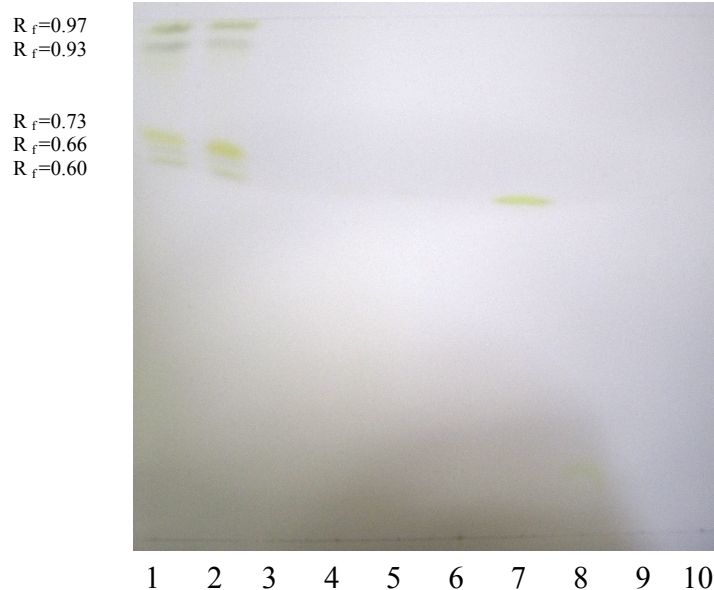
De manière générale, la concentration des antioxydants, ainsi que le nombre de groupements hydroxyles des composés phénoliques et leurs position spatiale contrôlent l'intensité du pouvoir réducteur (Kranl et al., 2005).

## **II-4-Caractérisation des extraits des feuilles et des racines de *Thapsia garganica L.***

### **II-4-1-Fractionnement des extraits**

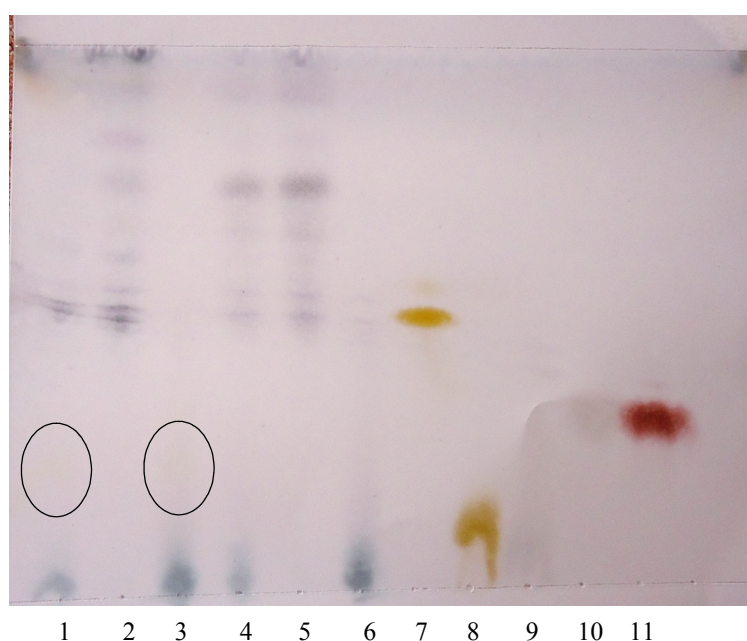
Les différents extraits de *Thapsia garganica L.* (feuilles et racines) ont été soumis à des chromatographies sur couche mince préliminaires pour pouvoir apporter un aperçu sur la nature des constituants que l'on peut rencontrer chez cette espèce. L'analyse du profil chromatographique des extraits à la lumière du jour (figure n°43) nous permet de constater que l'extrait éthanolique et l'extrait organique du chloroforme des feuilles ont laissé apparaître cinq bandes avec les même rapports frontaux, car l'extrait éthanolique contient la totalité des composés retrouvés dans les différentes fractions. Cependant nous ne remarquons aucunes bandes au niveau des extraits des racines ; cela serait probablement dû à la couleur très clair de nos extraits. A noter également l'apparition des spots correspondants aux deux standards utilisés (quercetine et rutine).





**Figure n°43:** profil chromatographique de tous les extraits des feuilles et des racines de *Thapsia garganica* L. réalisé à la lumière du jour. (1) : extrait éthanolique F ; (2) : extrait organique du chloroforme F ; (3) : extrait aqueux du chloroforme F ; (4) : extrait éthanolique R ; (5) : extrait organique du chloroforme R ; (6) : extrait aqueux du chloroforme R ; (7) : quercétine [R<sub>f</sub>= 60]; (8): rutine [R<sub>f</sub>=0.11]; (9) : acide gallique; (10): catéchine.

Le profil chromatographique révélé par la vanilline sulfurique des extraits de *Thapsia garganica* L. (figure n°44) montre la présence de plusieurs spots (précisément au niveau des racines); cela confirme la bonne séparation et le bon fractionnement (liquide-liquide) de nos extraits par le système de solvants choisi. Par ailleurs, nous constatons que le plus grand nombre de bandes se sont localisés au niveau des extraits organiques, ce qui pourrait supposer la richesse de notre plante en composés de polarité réduite. En outre, ce chromatogramme montre la présence de plusieurs spots de différentes couleurs correspondant à des composés phytochimiques bien définis (voir tableau n°VII).



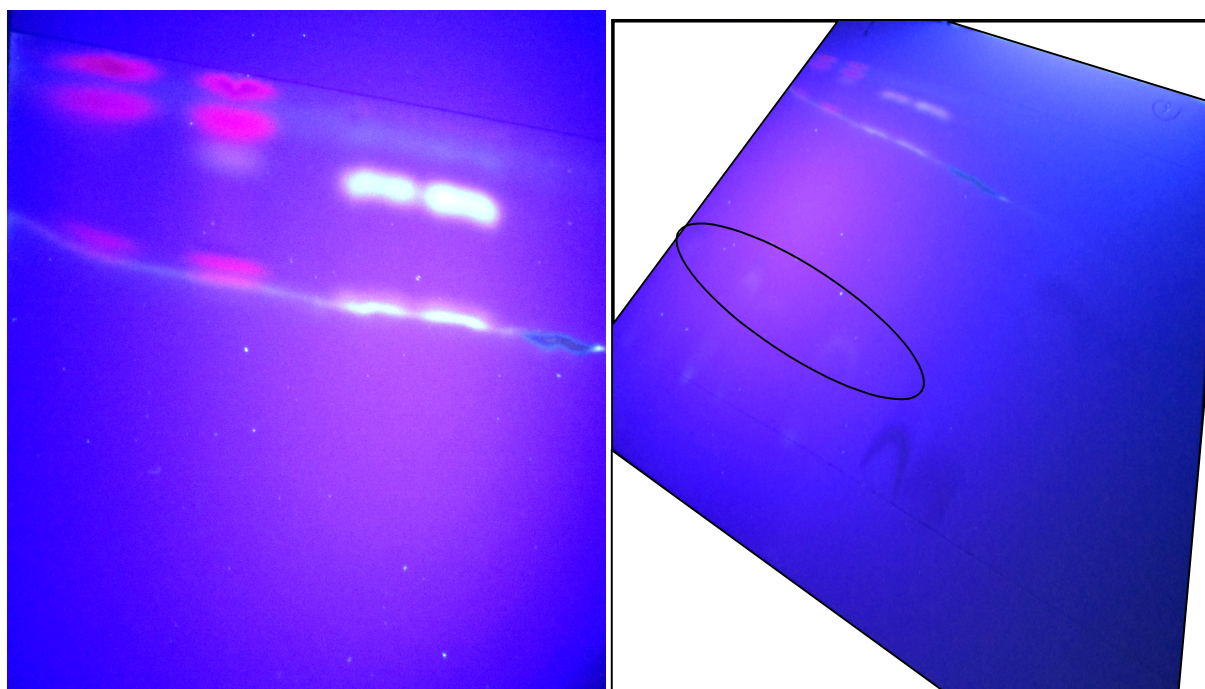
**Figure n°44:** profil chromatographique de tous les extraits de feuilles et de racines de *Thapsia garganica* L. pulvérisé avec la vanilline sulfurique. (1) : extrait éthanolique F ; (2) : extrait organique du chloroforme F ; (3) : extrait aqueux du chloroforme F ; (4) : extrait éthanolique R ; (5) : extrait organique du chloroforme R ; (6) : extrait aqueux du chloroforme R ; (7) : quercétine; (8) rutine; (9): acide gallique; (10) : acide tannique; (11): catéchine.

**Tableau n° VII:** les couleurs des bandes des extraits après révélation avec la vanilline sulfurique (Akhanovna et al., 2012):

Extraits	Bandes et couleurs	Composés
Extraits éthanolique et organique du chloroforme des feuilles.	-plusieurs spots gris -Spots violet -Spots orange	-acide gras. -monterpènes. -flavonoïdes.
Extraits éthanolique et aqueux du chloroforme des feuilles.	-Spots bleu -Spot jaune	-stéroïdes. -flavonoïdes.
Extraits éthanolique et organique du chloroforme racines.	-plusieurs spots gris	-acide gras
Extraits éthanolique et aqueux du chloroforme racines.	-Spots bleu	-stéroïdes.

Quant aux standards, ils apparaissent sous différentes couleurs à savoir: les flavonoïdes tels que la quercétine et la rutine en jaune, l'acide tannique et l'acide gallique en rose la catéchine en rouge brique.

Le profil chromatographique observé sous UV est présenté dans la figure n°45. Nous constatons que, les extraits éthanoliques ont laissé apparaître toutes les bandes retrouvées dans les différents extraits descendants. Nous déduisons également que l'extrait organique a donné le maximum de bandes, ce qui montre une autre fois que cette plante est riche en composés de polarité réduite.



**Figure n°45:** profil chromatographique de tous les extraits de feuilles et de racines de *Thapsia garganica* L. observés sous UV.

Nous remarquons également que les bandes des extraits éthanoliques sont partagées en deux parties à savoir la partie organique et aqueuse du chloroforme. Les spots de l'extrait organique se retrouvent en haut de la plaque chromatographique cela est évident étant donné que cet extrait contiendrait des composés apolaire qui seraient de ce fait entraînés par l'éluant; par contre l'extrait aqueux du chloroforme reste en bas de la plaque car il est retenu par le gel de

silice du fait de sa polarité. Ce chromatogramme révèle la présence de plusieurs bandes de différentes couleurs correspondant à des composés bien déterminés (voir tableau n°VIII).

**Tableau n°VIII :** Les couleurs des bandes des extraits sous UV (Akhanovna et al., 2012; Jork et al., 1994):

Extrait	Bands et couleurs	Composés
Extraits éthanolique et organique du chloroforme des feuilles.	-bandes oranges pale -bandes roses	-Anthocyanidine 3,5 di glucoside. -Anthocyanidine 3glucoside.
Extraits éthanolique et aqueux du chloroforme des feuilles.	-Spots blanc	-flavonoïdes.
Extraits éthanolique et organique du chloroforme racines.	-Spots bleu blanc fluorescent -Spots bleu pale	-Acides phénoliques -Acides phénoliques
Extraits éthanolique et aqueux du chloroforme racines.	-Spots blanc	-Flavonoïdes

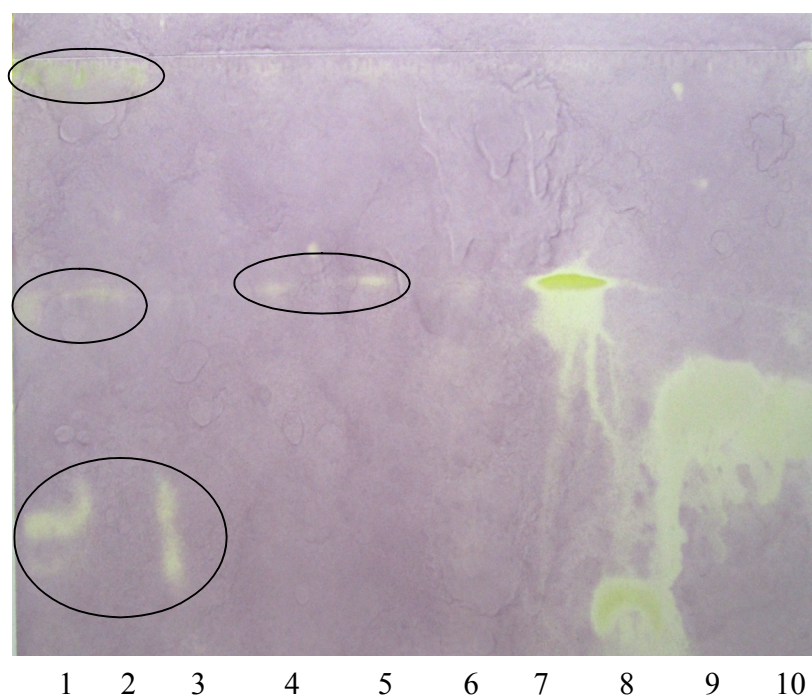
## II-4-2-Caractérisation de l'activité antioxydant

### 1) Caractérisation de l'activité scavenging du radical DPPH

Dans ce test, la réduction du radical DPPH° de couleur violette peut être visualisée par l'apparition de spots de couleur jaune.

A partir du chromatogramme (figure n°46), nous remarquons que ce sont les extraits éthanoliques des feuilles et des racines qui ont laissé apparaître le maximum de bandes actives (jaunes), étant donné qu'ils constituent les extraits bruts donc ils contiennent la totalité des composés phénoliques.

En outre, les extraits des feuilles ont montré une activité scavenging plus puissante que celle des racines ce qui explique l'apparition de plusieurs taches au niveau des extraits des feuilles.



**Figure n° 46:** profil chromatographique des extraits de *Thapsia garganica* L. pulvérisée avec le DPPH. (1) : extrait éthanolique F ; (2) : extrait organique du chloroforme F ; (3) : extrait aqueux du chloroforme F ; (4) : extrait éthanolique R ; (5) : extrait organique du chloroforme R ; (6) : extrait aqueux du chloroforme R ; (7) : quercétine; (8): rutine; (9) : acide gallique; (10): catéchine.

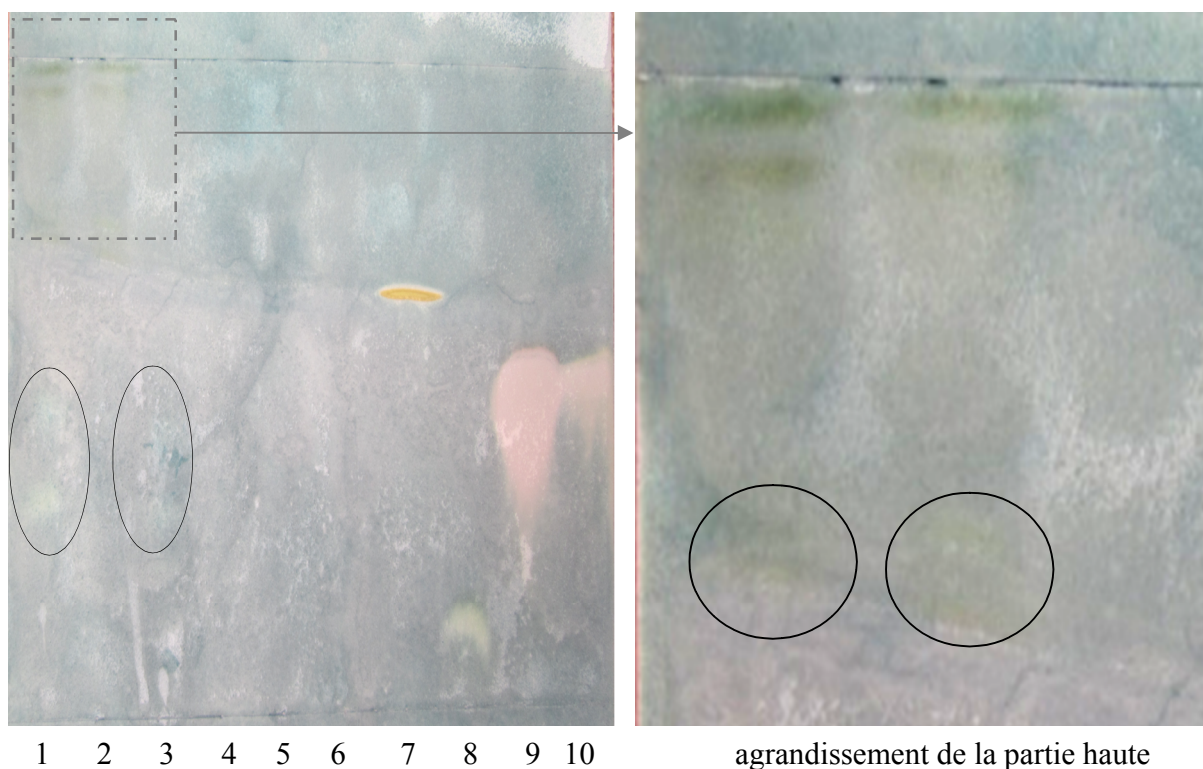
## 2) Caractérisation de l'activité inhibitrice du radical ABTS

Le principe est basé sur la manifestation de l'activité inhibitrice du radical ABTS par la décoloration des spots actifs.

D'après le profil chromatographique (figure n°47), nous observons la décoloration de six spots de l'extrait éthanolique des feuilles : deux spots en bas de la plaque qui sont également apparus dans l'extrait aqueux du chloroforme se qui s'explique par la polarité de ses composés qui ont une activité inhibitrice du radical ABTS, et quatre spots en haut de la plaque, qui sont présents aussi dans l'extrait organique du chloroforme, étant donné leur polarité réduite.



Dans le cas des racines, aucune décoloration ne s'est produite se qui implique que les racines ont une très faible activité scavenging du radical ABTS.



**Figure n°48 :** profil chromatographique des extraits de *Thapsia garganica L.* pulvérisée avec l'ABTS. (1) : extrait éthanolique F ; (2) : extrait organique du chloroforme F ; (3) : extrait aqueux du chloroforme F ; (4) : extrait éthanolique R ; (5) : extrait organique du chloroforme R ; (6) : extrait aqueux du chloroforme R ; (7) : quercétine; (8): rutine; (9) : acide gallique; (10): catéchine.

*CONCLUSION*  
*ET*  
*PERSPECTIVES*

## Conclusion et perspectives

Les plantes médicinales restent toujours une source fiable de principes actifs, *Thapsia garganica* L. est l'une de ces plantes, utilisée depuis longtemps à des fins thérapeutiques, mais les études phytochimiques de cette plante restent jusqu'à présent insuffisantes. Notre étude réalisée sur les extraits des feuilles et des racines de *Thapsia garganica* L. nous a permis d'aboutir aux résultats suivants :

L'extraction des composés phénoliques à partir des feuilles et des racines de *Thapsia garganica* L. a indiqué que ce sont les extraits organiques du chloroforme qui ont exhibé les taux d'extraction les plus élevés, ce qui nous permet de constater sa richesse en composés de polarité réduite.

➤ Les teneurs en phénols totaux de la plante ont été élevées et ce sont les feuilles qui ont exhibé les teneurs les plus importantes.

➤ Concernant le contenu en flavonoïdes, les feuilles de *T. garganica* L. ont montré des teneurs appréciables contrairement aux racines, et ce sont les extraits aqueux qui ont donné les valeurs maximales étant donné que les flavonoïdes constituent de petites molécules très polaires.

➤ Les extraits de *Thapsia garganica* ont dévoilé des taux satisfaisants en tanins condensés.

➤ Quant à l'activité antioxydante, nous déduisons que les extraits des feuilles ont exhibé une très forte activité scavenging du radical DPPH par rapport aux racines. De plus, nous constatons que ce sont les extraits aqueux qui ont été les plus forts par rapport aux extraits organiques ; cela a été en bonne corrélation avec le contenu en flavonoïdes qui constituent de puissants agents antioxydants.

➤ Néanmoins, le pouvoir réducteur et l'activité scavenging du radical ABTS<sup>•+</sup> de *Thapsia garganica* ont été faibles comparativement aux standards utilisés.

➤ Pour pouvoir apporter un aperçu sur la nature des constituants que l'on peut rencontrer chez cette espèce, une chromatographie sur couche mince a été réalisée.



L'analyse du profil chromatographique des extraits, à la lumière du jour, sous UV et après pulvérisation avec la vanilline sulfurique, a confirmé que les racines et les feuilles seraient riches en composés de polarité réduite. Parmi les composés phytochimiques détectés on retrouve: les acides gras, les monoterpènes, les stéroïdes, les anthocyanidines et les acides phénoliques.

➤ Par ailleurs, la caractérisation de l'activité scavenging des radicaux ABTS<sup>•+</sup> et DPPH par les extraits de la plante a montré encore une fois que les extraits obtenus à partir des feuilles sont plus efficaces que les extraits des racines.

➤ En fin, l'activité antioxydante peut être attribuée à la présence des polyphénols dans les extraits, les résultats indiquent une forte corrélation entre les activités antioxydantes testées et les composés phénoliques suggérant que les composés phénoliques sont probablement responsables de cette activité.

Ce travail nous a permis d'avoir un aperçu général sur les teneurs en composés phénoliques, la nature biochimique et les activités antioxydantes de *Thapsia garganica L.* Ainsi, nous souhaitons isoler, purifier et identifier les constituants biochimiques responsables de ces différentes activités par d'autres méthodes plus performantes et plus précises telles que la HPLC, GC-MS et RMN.

Par ailleurs, il serait très intéressant d'aller plus loin en essayant de réaliser ces tests antioxydants *in vivo* afin d'étudier l'efficacité et la toxicité des extraits ou des constituants biochimiques isolés ; aussi bien que de s'investir dans d'autres parties de la plante, à savoir, la tige, les fleurs et les graines.

*RÉFÉRENCES*  
*BIBLIOGRAPHIQUES*

A

- Abdou Bouba A., Njintang Y.N., Scher J. et Mbofung C.M.F. (2010). Phenolic compounds and radical scavenging potential of twenty Cameroonian spices. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 1(3): 213-224.
- Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin P. et Lomri A. (2007). Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases, 74: 636–643
- Aké B., Mamidou W. K., Kamanzi A.T. et Aké M. (2006). Évaluation de Quelques Propriétés Biologiques de Produit de Cueillette non Ligeux Vendus sur Les Marchés D'abidjan et ses Environs. *Vol : XIV. Pp : 1-17.*
- Akhanovna M. B. J., Benson, B. B., Christian, K. K., et Yves-Alain, B. (2012). Sur l'analyse qualitative et pharmacologique de 2 plantes antihypertensives utilisées à gramanssabo en Côte d'Ivoire. *Nature & Technologie*, 2-12.
- Ali H., Christensen S. B., Foreman I. J. C., Pearce F. L., Piotrowski W. et Thastrup O. (1985). The ability of thapsigargin and thapsigarginic to activate cells involved in the inflammatory response. *Br. J. Pharmac.* 85, 705-712.
- Amzal H. (2010). Étude de l'activité antioxydante des saponines du tourteau de l'argenier. These de Doctorat, Biochimie-Pharmacologie, Université Mohamed Vagdal A, p 25.
- Anonyme (A, B, C, D): [http://www.naturel\\_medicinal\\_herbs.net/herbs/t/thapsia-garganica=drias plant.php](http://www.naturel_medicinal_herbs.net/herbs/t/thapsia-garganica=drias plant.php)
- Appendino G., Prosperini S., Valdivia C., Ballero M., Colombano G., Billington R. A., Genazzani A. A. et Sterner O. (2005). SERCA-inhibiting activity of C-19 terpenolides from *Thapsiagarganica* and their possible biogenesis. *J. Nat. Prod.* 68:1213-1217.
- Avato P., Fanizzi F. P. et Rosito I. (2001). The Genus *Thapsia* as a source of petroselinic acid. *Vol: 36. Pp: 45-850.*

B

- Ba K., Tine E., Destin J., Cissé N. et Thonart P. (2010). Etude comparative des composés hénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 14 (1): 131-139.
- Bahorun T. (1997). Substances naturelles actives: la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle Ed AMAS. Pp : 12-17.

- Balasundram N., Sundram K. et Samman S. (2006). Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99: 191–203.
- Ballinger S. W. (2005). Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease. *Free Radical Biology et Medicine*, 38 : 1278-1295.
- Bammi J. et Douira A., (2002). Contribution a la connaissance de la flore vasculaire de la forêt de l'Achach, plateau central (MAROC). Malaga, Acta Botanica Malacatina. Vol : 29.Pp :23-41
- Barouki R. (2006). stress oxydant et vieillissement, 22:266-272.
- Beaudeau J.L., Delattre J., Therond P., Bonnefont-Rousselot D., Legrand A. et Peynet J. (2006). Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose. *Immunoanalyse & Biologie Spécialisée*, 21 : 144-150.
- Bérard E. (1997). Métabolisme et régulation du monoxyde d'azote : un médiateur de contrôle difficile, 4:1004-1011.
- Berger M. M. (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16 :260-267.
- Bijoy M., Jayati, S. et Prabir, K.S. (2008). Antioxidant activities of soybean as affected by Bacillus-fermentation to kinema. *Food Research International*, 41: 586 - 593.
- Boizot N. et Charpentier, J.P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *INRA – Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières, Laboratoire d'Analyses Biochimiques*.
- Bonnefont-Rousselot D., Peyet J., Beaudeau J.-L., Therond P., Legrand A. et Dellatre J. (2002). Stress oxydant, fonctions vasculaires et athérosclérose. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16 : 260-267.
- Borchardt J.R., Wyse D.L., Sheaffer C.C., Kauppi K.L., Fulcher R.G., Ehlke N.J., Biesboer D.D. et Bey R.F. (2008). Antioxidant and antimicrobial activity of seed from plants of the Mississippi river basin. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2(4): 081-093.
- Bossu C. M.; Ferreira, E. C.; Chaves, F. S. ; Menezes E. A. et Nogueira A. R. A. (2006). Flow injection system for hydrolysable tannin determination. *Microchemical Journal*, 84: 88-92.
- Bruneton J. (1993). Les composés phénoliques. In « pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales ». 2<sup>ème</sup> édition Lavoisier, Paris : p212-226.

- Bruneton J. (1999). Les composés phénoliques. In « pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales ». 3<sup>ème</sup> édition, Tec et Doc Lavoisier, Paris : p240-389.
- Bruneton J. (2005). Plantes toxique pour l'Homme et les animaux ». 3<sup>ème</sup>ed. Edition Lavoisier. p: 111-112.
- Brzozowska J. et Hanower P. (1976). Sur les composés phénoliques des végétaux et leur rapport avec un déficit hydrique chez des cotonniers. Tome.XII.p: 65-87.

©

- Cheynier V. V., Souquet M. H., Fulcrand P. et Sarni M. (1998). Moutounet Extrait de «Les composés phénoliques Journée Technique.
- Chiang H.C., Lo Y.J. et Lu F.J. (1994). Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *Alsophilaspinulosa* (Hook) Tryon. *Enzyme Inhibition*, 8 (1): 61-71.
- Cowan M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12 (4): 564-570.
- Curtay J.-P. et Robin J.-M. (2000). Intérêt des complexes antioxydants. *Nutritherapie Info*.
- Cuvelier C., Dotreppe O. et Istasse L. (2003). Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E. *Ann. Méd. Vét.*, 147: 315-324.

D

- Dastmalchi K., Dorman, H. J. D.; Oinonen P. P.; Darwis Y.; Laakso I. et Hiltunen, R. (2007). Chemical composition and *in vitro*antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L. extract. *Food Science and Technology*, 41: 391-400.
- Deby-Dupont G., Deby C. et Lamy M. (2002) ; Éditions scientifiques et médicale Elsevier SAS. Données actuelles sur la toxicité de l'oxygène, 11 :28-39 .
- Del Río J.I., Báidez A.G., Botía J.M. et Ortuño A. (2003). Enhancement of phenolic compounds in olive plants (*Olea europaea* L.) and their influence on resistance against *Phytophthora* sp. *Food Chemistry*, 83: 75-78.
- Dhiraj A. V., Ghaedian R. et Shetty K. (2005). Enhancing health benefits of berries through phenolic antioxidant enrichment: focus on cranberry .14 (2): 120-130.
- Djeridane A., Yousfi M., Jean Michel B.M. et Stocker P. (2010). Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the *in vitro* antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food and Chemical Toxicology*.48; 2599-2606.

- Djeridane A.M., Yousfi B., Nadjemi D., Boutassouna P. et Stocker N. (2006). Vidal Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds *Food Chemistry*, 97: 654–660.
- Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Vidal N., Lesgards J.F. et Stocker P. (2007). Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology*. 224: 801–809.
- Drew D.P., Krichau N., Reichwald K. et Simonsen H.T. (2009). Guaianolides in apiaceae: perspectives on pharmacology and biosynthesis. *Phytochem.Rev.* 8:581–599.
- Dobignard A. et Chatelain C., (2011). Index synonymique et bibliographique de la flore d’Afrique du Nord. Vol. 1, 2, 3, vol. 4 et 5 in pres.
- Durand T., Cracowski J.L. et Berdeaux O. (2005). Les isoprostanes, biomarqueurs de peroxydation lipidique chez l’homme. Partie 1. Nomenclature et synthèse. 53 : 349–355.

ƒ

- Favier A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L’actualité chimique*: 108-115.
- Flourie F., Arab K., Rossary A. et Steghens J.P. (2006). Immuno-analyse et biologie spécialisée, 21. 229-233.
- Forceville X. P. et Antwerpen V. (2008) .Composés sélénisés et sélénium, quelle place en réanimation ,17 :442-453.
- Fournier C. (2009). Chromatographie analytique sur couche mince et purification d’un produit à l’aide d’une colonne chromatographique. *Chimie Organique IA*.

g

- Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z. et Jore D. (2003). Espèces réactives de l’oxygène. Comment l’oxygène peut-il devenir toxique? *L’actualité chimique*: 91-96.
- Gausson H., Leroy J-F. et Ozenda P. (1982). Précis de botanique. Végétaux supérieurs. 2<sup>ème</sup> Edition. Tome.2. 579 p.
- Gervaise Y. (2004). Analyse des antioxydants naturels dans les matières premières et les produits. *Polyphénols-Euroforum*.

- Ghisolfi-Marque A., Boyer M. J., Vellas B., Thouvenot P. j., Albarède L. J. et Ghisolfi J. (1996). Activité antioxydant, lipoperoxydation et vieillissement chez l'homme, 50 : 151-160.
- Gómez F. L. M. (2007). Síntesis de análogos de las taspigarginas. Mémoire en vue d'obtention du grade de doctorat en chimie. Département de chimie organique. Faculté des sciences. Université de Cádiz. Puerto Real. Espagne.
- Goudable J. et Favier A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutr. Clin. Métabol.*, 11: 115-120.
- Ghedira K. (2005) Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emploi thérapeutique. *Phytothérapie*, 4 : 162-169.
- Guignard J.L. (1998). Abrégés botaniques. 11<sup>ème</sup> Ed. Masson. 166-171. ISBN : 2-225-83519-5.
- Groussard C. (2006). Stress oxydatif et exercice anaérobie. *Science & Sport*, 21: 62-67.
- Gurif F. (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27: 1 - 93.

### I

- Halliwell B. (2007). Oxidative stress and cancer: have we moved forward. 401 : 1-11 .
- Hand R., (2011). Apiaceae. in: Euro +Med Plantbase – the information resource for Euro-Mediterranean plant diversity. *Biophysics in press*.
- Havsteen B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids.
- Heim K. E., Tagliaferro A. R. et Bobilya D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 572–584.
- Hemalatha S., Lalitha P. et Arulpriya P. (2010). Antioxidant activities of the extracts of the aerial roots of *Pothos aurea* (Linden ex Andre). *Der Pharma Chemica*, 2 (6): 84-89.
- Hénaff M. (2006). Stress oxydatif et VIH: les antioxydants qui déroutent. *Le journal d'usage*, p: 188.
- Hoorn D. E. C. V., Nijveldt R. J., Leeuwen P. A. M. V., Hofman Z., M'Rabet L., De Bont D. B. A. et Norren K. V. (2002). Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids. *European Journal of Pharmacology*, 451: 111-118.

- Hseini S., Kahouadji A., Lahssissene H. et Tijane M. (2007). Analyses floristique et ethnobotanique des plantes vasculaires médicinales utilisées dans la région de Rabat (Maroc occidental). *Lazaroo*, 28 : 93-100.
- Huet O. et Duramteau J. (2008). Dysfonction endothéliale : Rôles des radicaux libres. *Réanimation*, 17 : 378-392.

### J

- Jork H., Funk W., Fischer W. et Wimmer H. (1994). Thin-Layer Chromatography: reagents and detection methods. 1: 448.

### K

- Karou D., Dicko M., Simpore J. et Traore A.S. (2005). Antioxidant and antibacterial activities of polyphénols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *African Journal of Biotechnology*, 4 (8):823-828.
- Kathiresan K. (2003). Insect folioivory in mangroves. *Indian Journal of Marine Sciences*, 32 (3): 237-239.
- Khaled S., Brun J. F., Bardet L. et Cassanas G. (1997). Importance physiologique du zinc dans l'activité physique. *Science et sports*, 12: 179- 191.
- Kmoníčková E., Melkusová P., Harmatha j., Vokáč K., Farghali H. et Zidek Z. (2008). Inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase thapsigargin stimulates production of nitric oxide and secretion of interferon-gamma *European Journal of Pharmacology*, 588: 85–92.
- Koechlin-Ramonatxo C. (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires, 20 :165–177.
- Krause D.O., Wendy J.M., John D.S. et Christopher B.S. (2005). Sweeney a Tolerance mechanisms of streptococci to hydrolysable and condensed tannins, 121: 59–75.
- Kranl k., Schlesier k., Bitsch R., Hermann H., Rohe M. et Bohm V.(2005). Comparing antioxidative food additive and secondary. 93: 171-175.

### L

- Ladjel S., Zellagui A. et Gherraf N. (2011). Investigation of essential oil content of *thapsiagarganica* grown in the east of Algeria. *Revue des science fondamentales et appliqués*. 3(2): 30-34.



- Le K., Chiu F. et Ng K. (2007). Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry*, 105: 353–363.
- Laguerre M., Lecomte J. et Villeneuve P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46: 244–282.
- Lauzer M. (1868). *Revue de thérapeutique médico chirurgicale*. P : 39.
- Lin C.M., Chen C.S., Chen C. T., Liang Y.C. et Lina J.K. (2002). Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294: 167–172.
- Lin H. C., Tsai S. H., Chen C. S., Chang Y. C., Lee C. M., Lai Z. Y. et Lin C. M. (2008). Structure–activity relationship of coumarin derivatives on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavenging activities. *Biochemical pharmacology*, 75: 1416- 1425.
- Liu H., Jensen K. G., Lin h My Tran L. M., Chen M., Zhai L., Olsen C. E., Sohoel H., Denmeade S. R., Isaacs J.T. et Christensen S.B. (2007). Cytotoxic phenylpropanoids and an additional thapsigargin analogue isolated from *Thapsigarganica*. *Phytochemistry*. 67 : 2651–2658.

### *M*

- Makunga N. P., Anna K., et Staden J. (2006). Improved in vitro rooting and hyperhydricity in regenerating tissues of *Thapsigarganica* L, 86:77–86.
- Marfak A. 2003. Radiolyse gamma des flavonoides. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation de depsides. Thèse de doctorat Université de Limoges. P 1-220.
- Martin S. et Andriantsitohaina R. 2002. Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annale de ardiologie et d'angiologie* 51 (6) : 303-315.
- Martínez-Flórez S., González-Gallego J., Culebras J.M. et Tuñón M.J. (2002). Los flavonoïdes: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* 17:271-278.
- Meftah T., Sengui R., Djennas A. et Benabbes O. (2001). Connaissance, valorisation et contrôle de l'utilisation de la flore sauvage en médecine traditionnelle (plante médicinales). Programme U.I.C.N. pour l'Afrique du nord. and an addition, thapsigargin analogue isolated from *Thapsia garganica*. *Phytochemistry*. 67 : 2651–2658.

- Molyneux P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakar J. Sci. Technol.* 26.2: 211-219.



- Nacz M. et Shahid F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in foods. *Journal of chromatography A.* 1054: 95-111.
- Nakatsubo F., Enokita K., Murakami K., Yonemori K., Sugiura A., Utsunomiya N., et Subhadrabandhu S. (2002). Chemical structures of the condensed tannins in the fruits of *Diospyrosspecies*. *J. Wood Sci.*48. p: 414-418.
- Nelson M.N. et Stolz B.M. (2007). Progress toward the Synthesis of the Basiliolides and Transtaganolides: An Intramolecular Pyrone Diels-Alder Entry into a Novel Class of Natural Products. *Organic Letters*, xxx: 3-7.
- Nicholls P. (2012). Classical catalase: Ancient and modern. *Archives of Biochemistry and Biophysics in press.*



- Ogunlana O. E. et Ogunlana O. O. (2008). In vitro assessment of antioxidant activity of *Newbouldialaavis*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2 (8): 176-179.
- Oyedemi S. et O., Afolayan A.j. (2011). In vitro and in vivo Antioxidant Activity of Aqueous Leaves Extract of *Leonotis (L.)R.Br.* *International Journal of Pharmacology*, 7(2): 248-256.



- Parihar A., Parihar M. S., Milner S. et Bhat S. (2008). Oxidative stress and anti-Focus on antioxidant enzymes and antioxidant oxidative mobilization in burn injury. *Burns*, 34: 6-17.
- Pasquier C., (1995). Stress oxydatif et inflammation. *Revue française des laboratoires*, 276 : 87 - 92.
- Pervaiz S. et Clement M.V. (2007) superoxide anion: Oncogenic reactive oxygen species? *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39:1297–1304.
- Pincemail J. et Defraigne J.O. (2004). Les antioxydantes : un vaste réseau de référence pour lutter contre effet toxiques de l'oxygène.
- Pincemail J., Defraigne J. O., Meurisse M. et Limet R. (1998). Antioxydants et prévention des maladies cardiovasculaires, 2ème partie: la vitamine E. *Medi Sphere*.

- Pincemail J., Defraigne J. O., Meurisse M. et Limet R. (1998). Anti-oxydants et prévention des maladies cardiovasculaires, 3ème partie: caroténoïdes et vitamine
- Pincemail J., Meurisse M., Limet R. et Defraigne J. O. (1999). Espèces oxygénées activées, antioxydants et cancer. *Vaisseaux, Coeurs, Poumons*, 4(4).
- Prior R. L., Wu X. et Schaich K. (2003). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 53, 4290-4302.

### R

- Rached W., Benamar H., Bennaceur M., et Marouf (2010). Screening of the Antioxidant Potential of Some Algerian Indigenous Plants. *Journal of Biological Sciences*, 10 (4): 316-324.
- Ré D. B., Nafia I., Nieoullon A., Le Goff L. K. et Had-Aissouni L. (2005). Stress oxydatif cérébral: les astrocytes sont-ils vulnérables aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate ? Implications sur la survie neuronale. *Annales Francaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 24 : 502-509.
- Reimund J.M. (2002). Stress oxydant au cours des syndromes inflammatoires chroniques Oxidative stress in chronic inflammatory syndromes, 1275–284.
- Ren W., Qiao Z., Wang H., Zhu L. et Zhang L. (2003). Flavonoids: Promising Anticancer Agents.
- Ribéreau-Gayon P. (1968). Les composés phénoliques des végétaux. *Dunod, paris*.
- Rohlf G. (2002). Voyages et explorations au Sahara. 253 p.
- Rubal J., Moreno D., Guerra F. M., Zacarias D. J., Saouf A., Akssira M., Mellou F.R., Guillermo M. et Massanet A. (2007). Pyran-2-one and four monoterpenoids from *Thapsia transtaganana* and their implication in the biosynthesis of transtaganolides *Phytochemistry*, 68: 2480–2486.
- Ryan D., Antolovich M., Prenzler P., Robards k. et Lavee S. (2002). Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea L.* *Scientia Horticulturae*, 92: 147-176.

### S

- Sahgral G., Ramanatha S., Sasidharan S., Mordi M. N., Ismail S. et Mansor S. M. (2009). In Vitro Antioxidant and Xanthine Oxidase Inhibitory Activities of Methanolic *Swieteniamahagoni* Seed Extracts. *Molecules*, 14: 4476-4485.

- Saouf A., Guerra F. M. Juan J., Rubal A., Zacaras D., Jorge A., Akssira M., Mellouki F., Dorado M. J. et Juillermo M. (2006). Phenylpropanoids from *Thapsiatranstagana* Phytochemistry, 67: 800–808.
- Saraf S., Ashawat M.S. et Saraf S. (2007). Flavonoids: A Nutritional Protection against oxidative and UV induced cellular damages. *Pharmacognosy Reviews*, 1(1): 30-40.
- Schofield P., Mbugua D. M. et Pell A. N. (2001). Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 91: 21-40.
- Servais S. (2004). Altération mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'Ozone: effet de l'âge et d'une supplémentation en oméga-3. *Thèse de doctorat, Université Claude Bernard Lyon 1*.

⒯

- Tabassum I., Siddiqui Z. N. et Rizvi S. J. (2010). Protective effect of *Ocimum sanctum* and *Camellia sinensis* on stress-induced oxidative damage in the central nervous system of *Rattus norvegicus*. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 1 (4): 120- 134.
- Tawaha K., Alali F., Gharaibeh M., Mohammad M. et El-Elimat T. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry*, 104:1372–1378.
- Tsao R. et Deng Z. (2004). Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *Journal of Chromatography B*, 812: 85- 99.
- Zimmer N. et Cordesse R. (1996). influence des tannins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants, (3) 167-179.

⒱

- Valko M., Rhodes C. J., Moncol J., Izakovic M. et Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160:1–40.
- Vilano D.M., Fernandez-Pachon M.S., Moya M.L., Traoncoso A.M. et Garcia-Parrila M.C. (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*. 71: 230-235.

⒲

- Wassel G.M et Ahmed S.S. (1974). *Thapsia*, (F), *Tahpsiagarganica* (L), *Smooth thapsia* (E), Fa. Ombellifère. Vol: 29. Pp: 504-541.
- Winther AML., Liu H.Z., Sonntag Y., Olesen C., le Maire M., Soehoel H., Olsen C.E., Christensen S.B., Nissen P., et Moller J.V. (2010). Critical Roles of Hydrophobicity and Orientation of Side Chains for Inactivation of Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase with Thapsigargin and Thapsigargin Analogs. *J Biol Chem.* 285, 28883-28892.

Ð

- Yap C. F., Ho C. W., Wan Aida W. M., Chan S. W., Lee C. Y. et Leong Y. S. (2009). Optimazation of extraction condition of total phenolic compounds from star fruit (*Averrhoacarambola* L.) residues. *Sains Malaysiana*, 38 (4): 511- 520.

Ź

- Zazzo J.F. (2002). Stress oxydant au cours des états inflammatoires aigus et des états d'agression : implications pour la pratique clinique, 16 : 268–274.
- Zheng G., et Wang S.Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal agricultur food chemistry.* 49, 5165-5170.
- Zimmer N., et Cordesse R. (1996). Influence des tannins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants, (3) 167-179.

# *GLOSSAIRE*

## *Glossaire Botanique*

- **Angiosperme** : Végétal dont les organes reproducteurs sont condensés en une fleur et dont les graines fécondées sont enfermées dans un fruit, à la différence des gymnospermes dont la graine est à nu.
- **Dicotylédone** : Une plante dicotylédone est une plante angiosperme dont la graine dispose, comme son nom l'indique, de deux cotylédons.
- **Dressé** : Qui prend à peu près la direction verticale par opposition à rampant couché ou ascendant.
- **Fleur** : Organe de la reproduction chez les végétaux supérieurs, les phanérogames.
- **Florifère** : Qui porte des fleurs.
- **Gaine** : Prolongement du pétiole.
- **Graine**: partie plus ou moins dilatée de la base d'une feuille entourant la tige.
- **Inflorescence** : est la disposition des fleurs sur la tige d'une plante à fleur.
- **Ombelle** : Inflorescence typique des Ombellifères (Apiacées). Les pédoncules floraux sont tous insérés au même point de la tige, et les fleurs sont toutes disposées sur une même surface sphérique
- **Vivace** : Qualifie une plante vivant plus de deux ans, mais qui vit souvent beaucoup plus longtemps, la limite de deux ans étant fixée pour séparer les vivaces des bisannuelles.
- **Pétiole** : partie rétrécie de la feuille, qui lui sert de support.

## *Glossaire Médical*

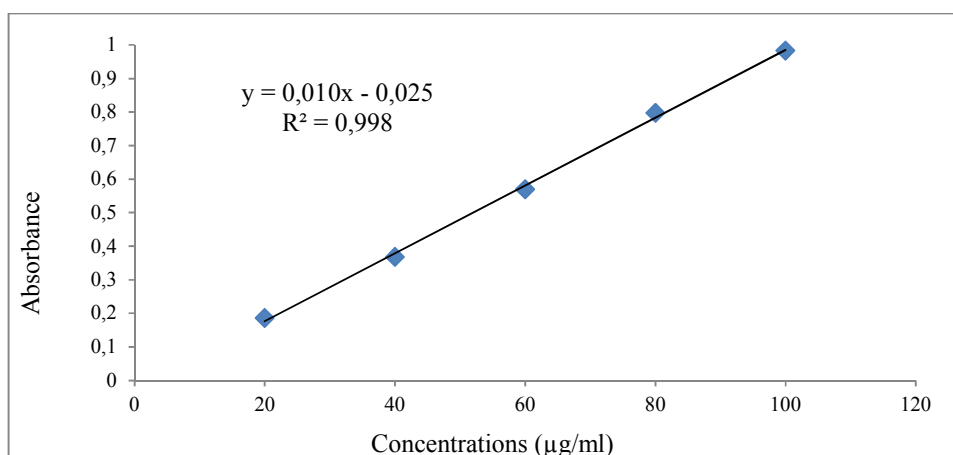
- **Affection** : Etat d'un individu en rapport avec la maladie. Elle se caractérise par l'état pathologique d'un organisme, traduisant d'une maladie
- **Apoptose** : ou (mort cellulaire programmée) processus par lequel des cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un signal. C'est l'une des voies possible de la mort cellulaire, qui physiologique, génétiquement programmée, nécessaire à la survie des organismes.
- **Athérosclérose** : Perte d'élasticité des artères due à la sclérose provoquée par l'accumulation de corps gras (lipides, essentiellement cholestérol LDL) au niveau d'une des trois tuniques constituant la paroi des artères (l'intima) et intéressant avant tous les grosses et les moyennes artères. La variété de lipides concernée porte le nom d'athérome.
- **Bronchite** : la bronchite est une irritation et une inflammation des bronches qui manifeste par une toux. On distingue la bronchite aiguë de la bronchite chronique.
- **Cancer** : le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération cellulaire anormalement important au sein d'un tissu normale d'un l'organisme, de telle manière que la survie de ce dernier est menacée. Ces cellules dérivent toutes d'un même clone, cellule initiatrice du cancer qui acquit certaines caractérisastiques lui permettant de se diviser indéfiniment. À la cour de l'évolution de la maladie, certaines cellules peuvent migrer de leur lieu de production et former des métastases.
- **Cardiovasculaire**: les maladies cardio-vasculaires sont les maladies qui concernent le cœur et la circulation sanguine.
- **Carcinome** (épithéliuma) : Tumeur maligne se développant aux dépens des tissus épithéliaux. Les tissus épithéliaux sont des tissus de recouvrement et de protection de la surface de certains organes du corps humain situés à l'extérieur, comme la peau, les muqueuses des orifices naturels, etc... Les tissus épithéliaux constituent également les glandes.



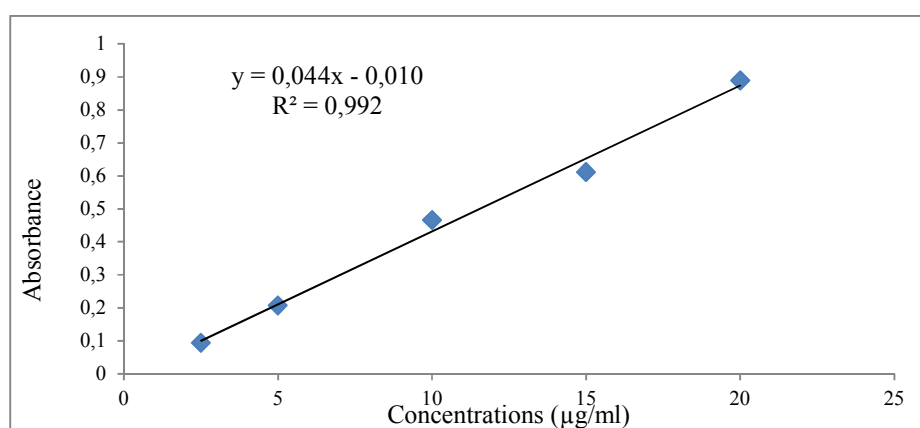
- **Cataplasme** : compresse humide ou bouillie épaisse que L'on applique sur une partie du corps comme agent thérapeutique.
- **Collagène** : une des scléroprotéines qui constituent la substance intercellulaire du tissu conjonctif.
- **Emétique** : qui fait vomir, sont des substances capable de provoquer un vomissement.
- **Diurétique** : médicament augmentant l'excrétion urinaire de l'organisme, utilisé dans le traitement de l'hypertension artérielle et des œdèmes.
- **Histamine** : Substance présente dans de nombreux tissus de l'organisme sous forme inactive sécrétée par des cellules appartenant à une variété de globules blancs, les polynucléaires basophiles, et les mastocytes, et jouant un rôle de médiateur (qui transfère une information) chimique dans l'hypersensibilité immédiate
- **Leucémie** : Une maladie appelée également cancer du sang ou leucose aiguë des organes hématopoïétiques (sang, rate, ganglions, moelle osseuse). Elle se caractérise par une sur-production de précurseurs des globules blancs dans la moelle osseuse et le sang.
- **Macrophage** : globule blanc dont la fonction principale est d'absorber les cellules étrangères à l'organisme.
- **Purgatif** : qui a la propriété de purger, d'évacuer le contenu de l'intestin.
- **Physiopathologie** : Discipline biologique qui traite des dérèglements de la physiologie. Elle traite à la fois les mécanismes physiques, cellulaires ou biochimiques qui conduisent à l'apparition d'une maladie et les conséquences de celle-ci.
- **Vasodilatateur** : Agent responsable de la dilatation des vaisseaux sanguins, c'est-à-dire d'augmenter leur lumen, en relâchant les muscles lisses des parois de ces vaisseaux contrairement à un vasoconstricteur.

# *ANNEXES*

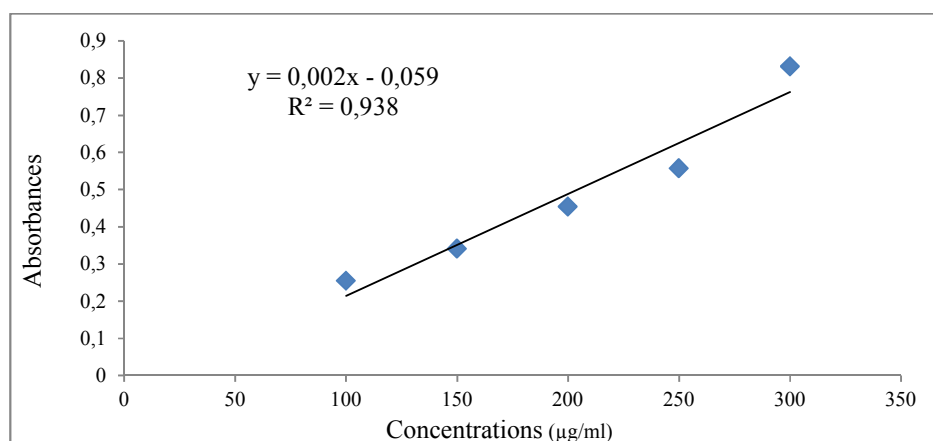
Annexes N°1: Courbes d'étalonnage utilisées pour le calcul des teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés.



**Figure 01** : Courbe d'étalonnage avec l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux ( $\lambda = 765\text{nm}$ ).

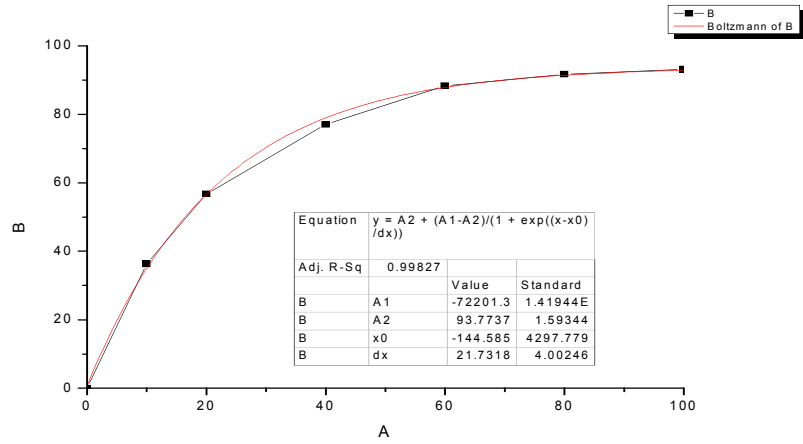


**Figure 02** : Courbe d'étalonnage avec la quercétine pour le dosage des flavonoïdes ( $\lambda = 430 \text{ nm}$ ).

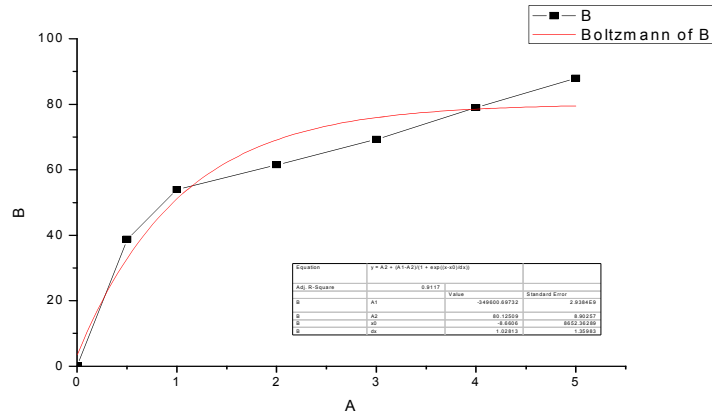


**Figure 03** : Courbe d'étalonnage avec la catéchine pour les proanthocyanidines ( $\lambda = 500 \text{ nm}$ ).

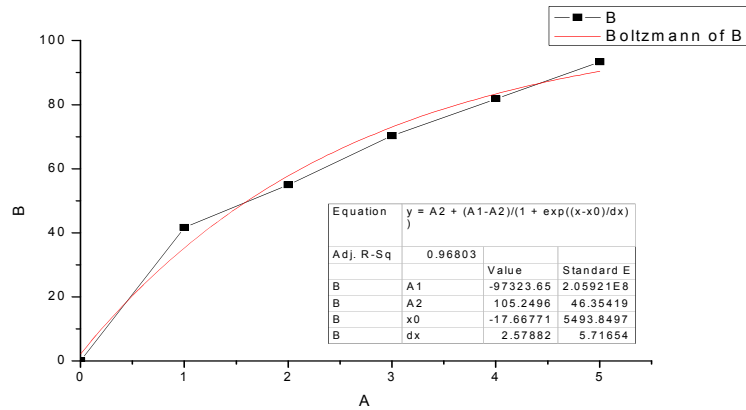
**Annexes N°2: Courbes de calcul de l'IC50 dans l'activité scavenging du radical DPPH**



**Figure 04:** courbe pour le calcul de l'IC<sub>50</sub> de l'extrait aqueux du chloroforme feuilles.

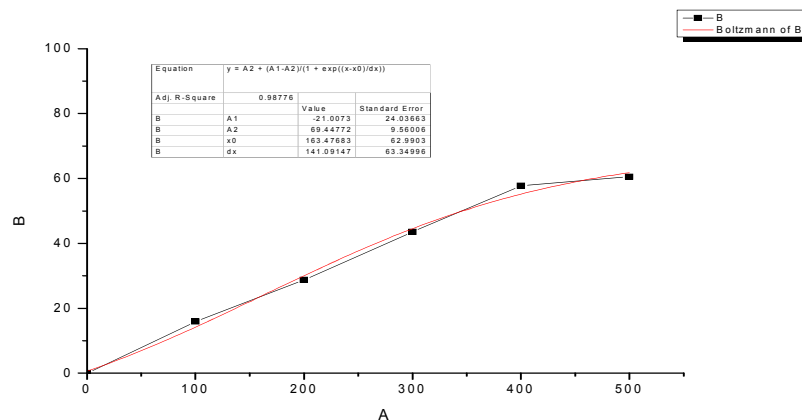


**Figure 05:** courbe pour le calcul de l'IC<sub>50</sub> de la BHA.

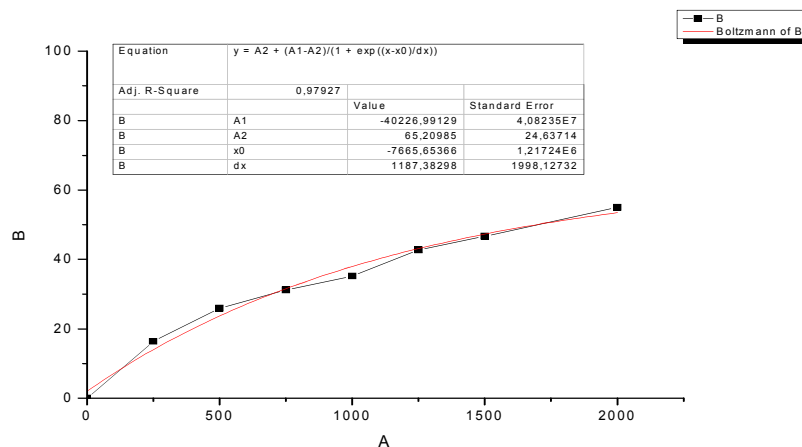


**Figure 06 :** courbe pour le calcul de l'IC<sub>50</sub> de l'acide ascorbique dans l'activité scavenging du DPPH.

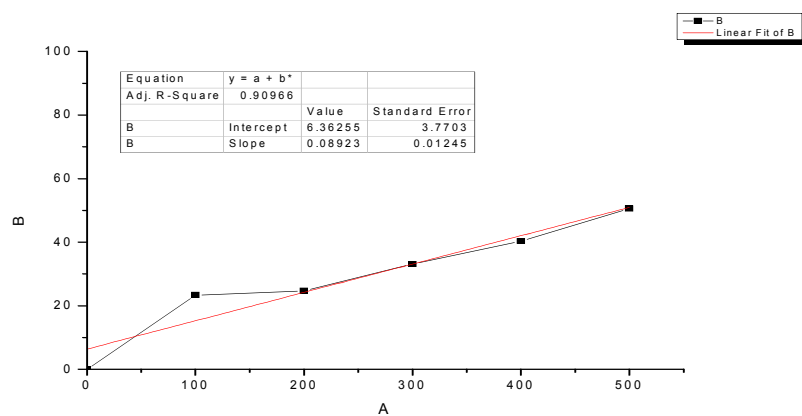
Annexes N°3 : Courbes de calcul de l'IC50 dans l'activité scavenging du radical ABTS pour les feuilles



**Figure 07 :** courbe pour le calcul de l'IC50 de l'extrait ethanolic des feuilles

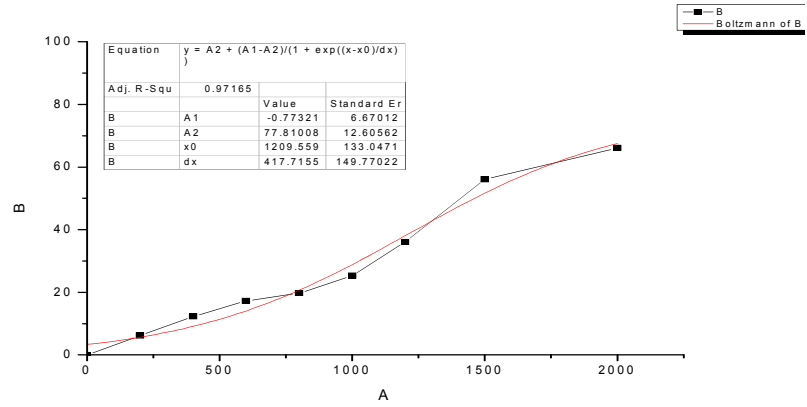


**Figure 08 :** courbe pour le calcul de l'IC50 de l'extrait organique du chloroforme feuilles.

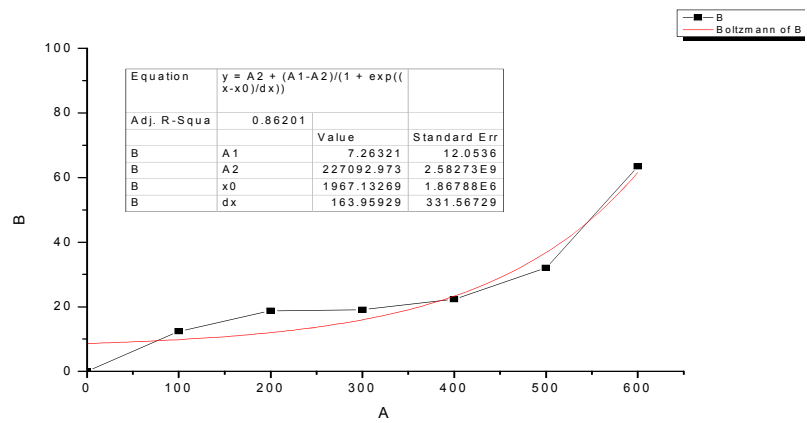


**Figure 09:** courbe pour le calcul de l'IC50 de l'extrait aqueux du chloroforme feuilles.

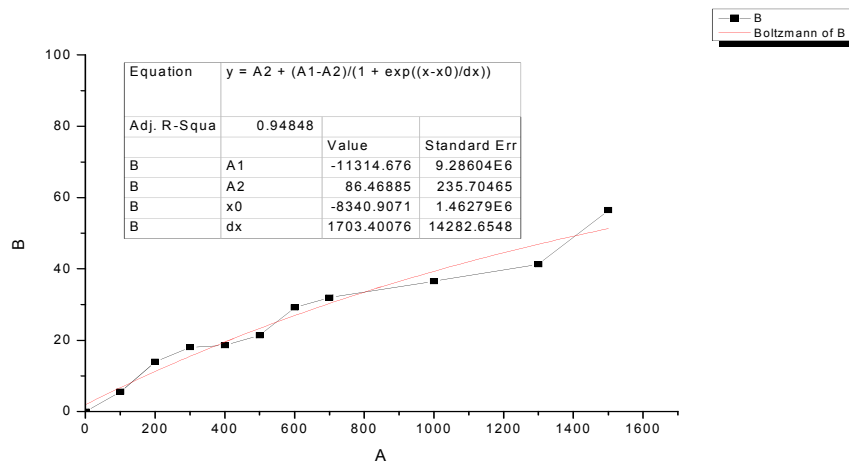
**Annexes N°4: Courbes de calcul de l'IC50 dans l'activité scavenging du radical ABTS des racines.**



**Figure 10 :** courbe pour le calcul de l'IC<sub>50</sub> de l'extrait ethanologique des racines.

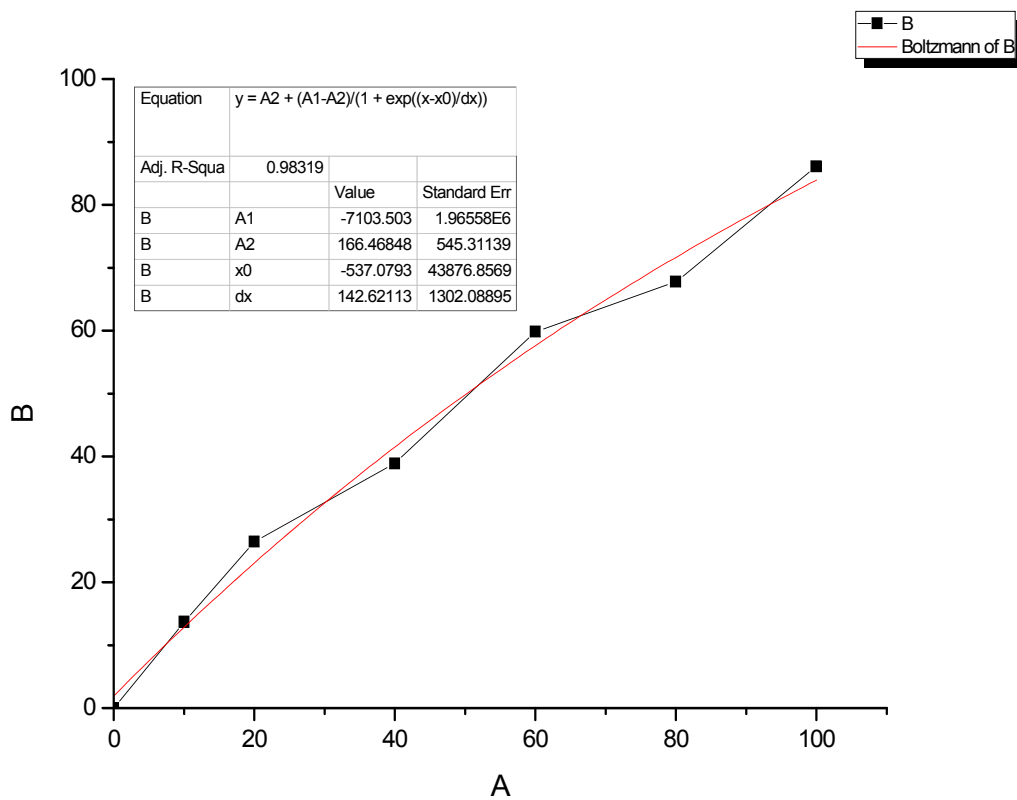


**Figure 11 :** courbe pour le calcul de l'IC<sub>50</sub> de l'extrait organique du chloroforme feuilles.



**Figure 12:** courbe pour le calcul de l'IC<sub>50</sub> de l'extrait aqueux du chloroforme feuilles.

Annexes N°5 : Courbes de calcul de l'IC50 dans l'activité scavenging du radical ABTS de Trolox.



**Figure 13:** courbe pour le calcul de l'IC<sub>50</sub> de Trolox

Annexes N°6: Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical DPPH et la teneur en phénols totaux, en flavonoïdes et en proanthocyanidine des extraits.

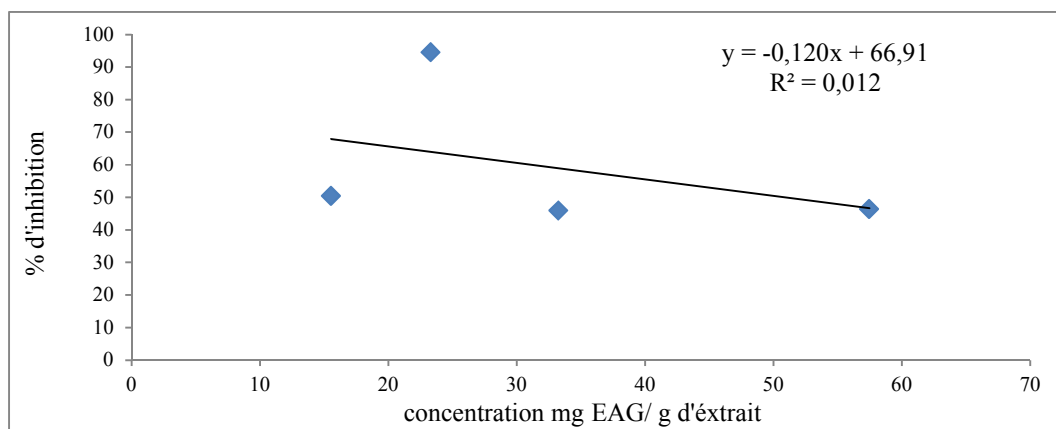


Figure N° 14: Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical DPPH et la teneur en phénols totaux.

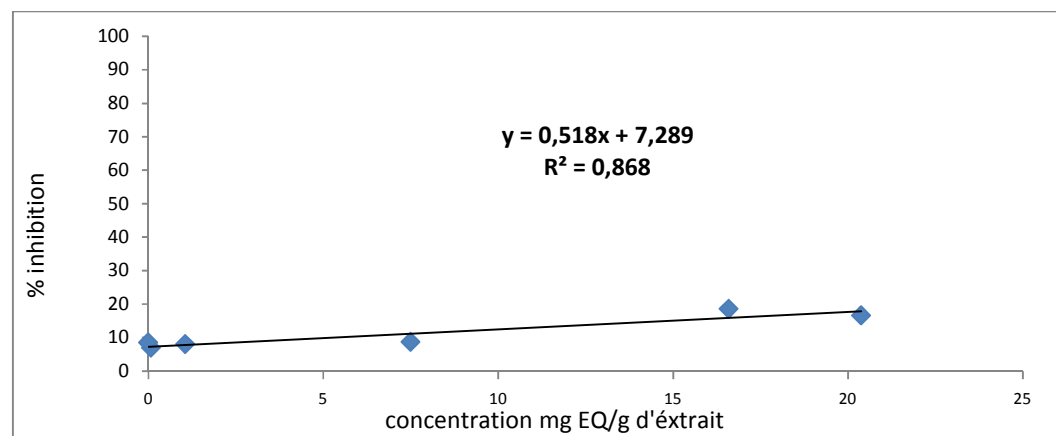


Figure N°15: courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical DPPH et la teneur en flavonoïdes.

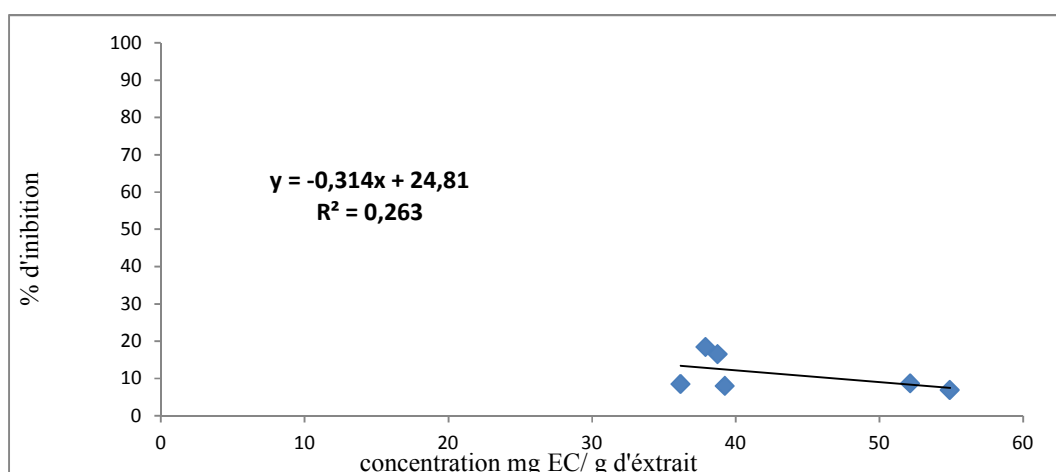


Figure N°16: Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical DPPH et la teneur en proanthocyanidines.



Annexes N°7: Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical ABTS et la teneur en phénols totaux, en flavonoïdes et en proanthocyanidine des extraits.

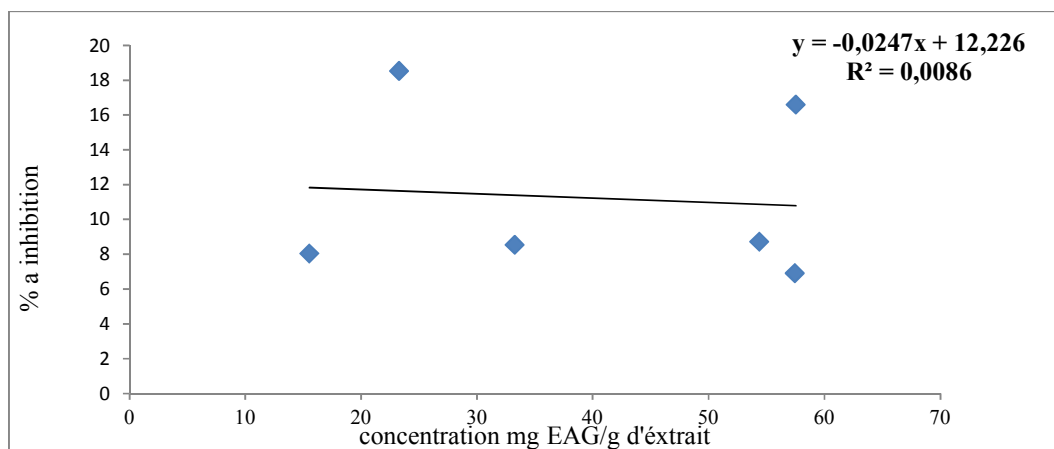


Figure N°17: courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical ABTS et la teneur en phénol totaux.

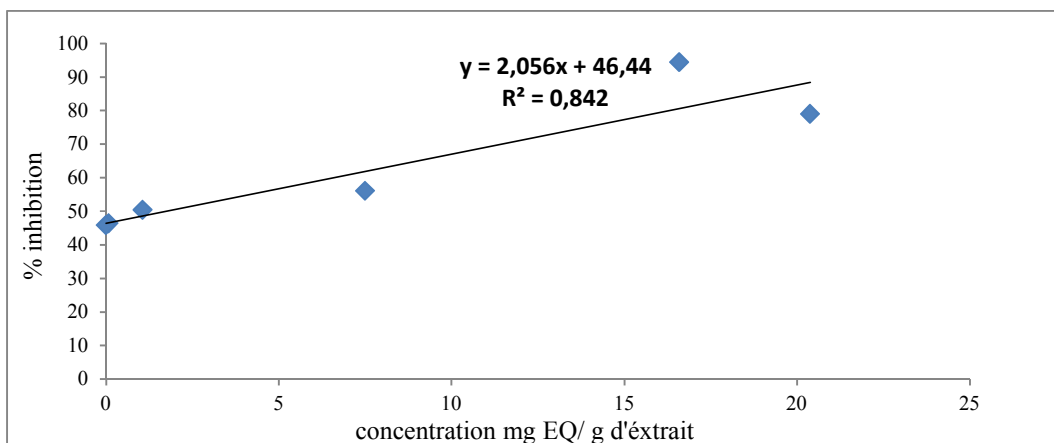


Figure N°18: courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical ABTS et la teneur en flavonoïdes.

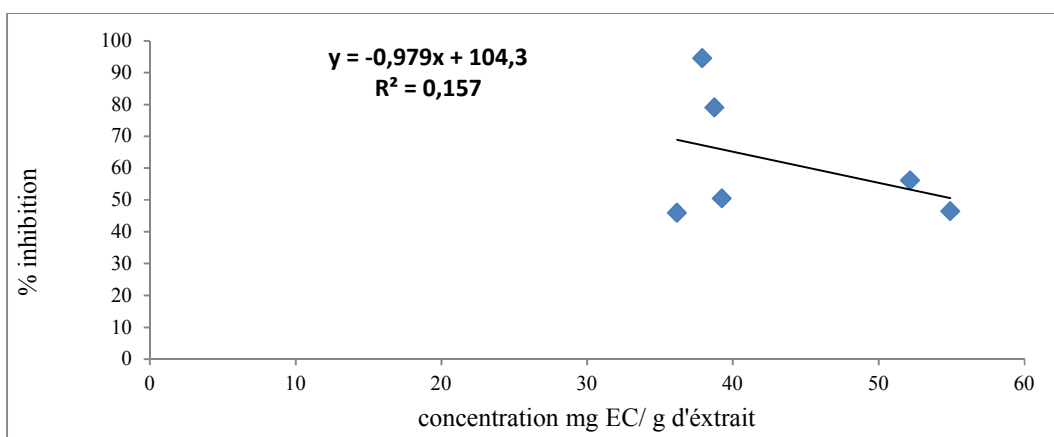
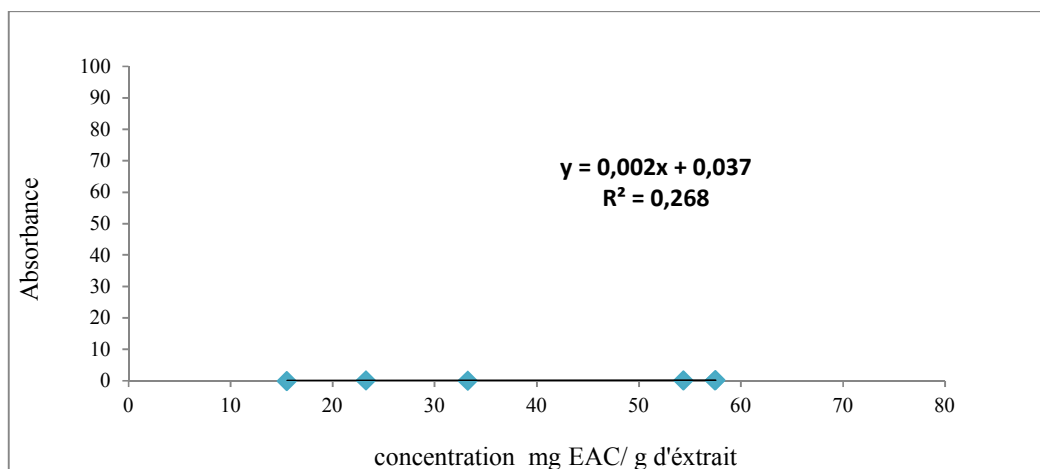
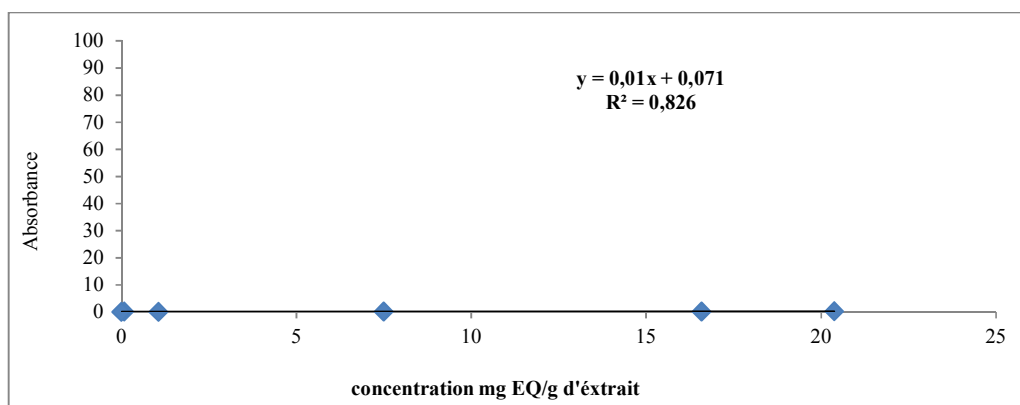


Figure N°19: courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical ABTS et la teneur en proanthocyanidines.

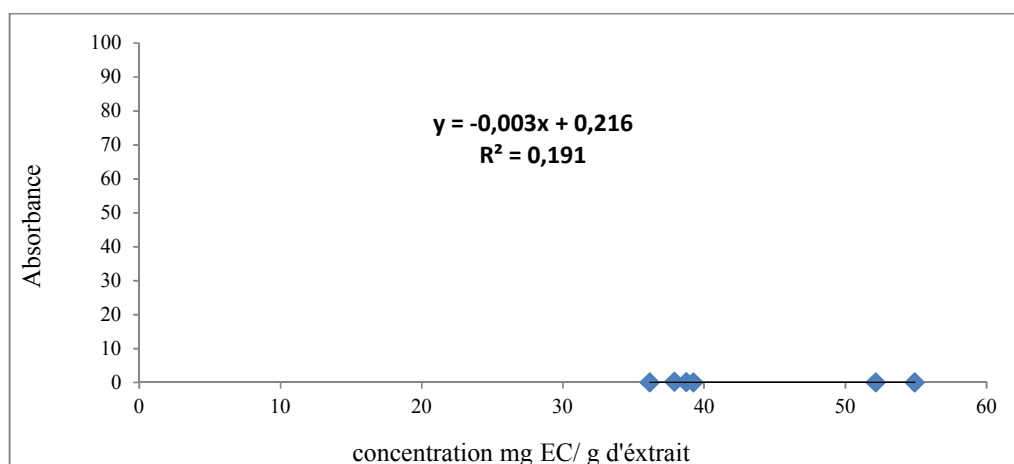
Annexes N°8: Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du pouvoir réducteur et la teneur en phénols totaux, en flavonoïdes et en proanthocyanidine des extraits.



**Figure N°20:** courbe de corrélation entre le pouvoir réducteur et la teneur en phénol totaux.



**Figure N°21:** courbe de corrélation entre le pouvoir réducteur et la teneur en flavonoïdes.



**Figure N°22:** courbe de corrélation entre le pouvoir réducteur et la teneur en proanthocyanidines.

## Résumé

Les antioxydants jouent un rôle fondamental dans l'élimination de l'excès toxique en espèces réactives de l'oxygène à l'origine de diverses maladies dégénératives. Ainsi, l'exploitation des molécules végétales naturelles serait très bénéfique pour la santé humaine. Par conséquent, on s'est intéressé à l'évaluation de l'activité anti-oxydante des composés phénoliques extraits à partir d'une plante médicinale locale, *Thapsia garganica* L., et cela en faisant trois types de manipulations, après, bien évidemment, avoir obtenu les différents extraits des feuilles et des racines de notre plante. D'abord, on a effectué le dosage des composés phénoliques (phénol totaux, flavonoïdes, et tanins condensés) pour pouvoir faire une appréciation qualitative et quantitative ; puis, on est passé à la mesure de l'activité anti-oxydante des extraits en réalisant trois tests : le pouvoir réducteur et l'activité scavenging des deux radicaux DPPH<sup>•</sup> et ABTS<sup>•+</sup>. On a clôturé notre étude par le fractionnement et la caractérisation de l'activité antioxydante des extraits par chromatographie sur couche mince. Les résultats expérimentaux ont révélé que les extraits de *Thapsia garganica* L. ont été riches en phénols totaux et ont montré des concentrations moyenne en flavonoïdes et des teneurs appréciables en tanins condensés. Quant aux activités antioxydantes de la plante, les extraits ont été de très bons scavengers du radical DPPH. En revanche, l'activité inhibitrice du radical ABTS<sup>•+</sup> et le pouvoir réducteur ont été faibles. Finalement, l'analyse des profils chromatographiques des extraits a confirmé que les racines et les feuilles seraient riches en composés de polarité réduite. Par ailleurs, la caractérisation de l'activité scavenging des radicaux ABTS<sup>•+</sup> et DPPH<sup>•</sup> des extraits de la plante a montré encore une fois que les feuilles sont plus efficaces que les racines. Ces constatations nous laissent imaginer des études plus poussées sur des extraits d'une panoplie de plantes médicinales afin d'en bénéficier d'avantage.

**Mots clés :** *Thapsia garganica* L., radicaux libres, antioxydants, composés phénoliques, CCM.

## Abstract

The antioxidants play a basic role in the elimination of the toxic reactive oxygen species excess. Thus, the exploitation of natural plant molecules will be very beneficial for the human health. Therefore, we were interested by the evaluation of the anti-oxidant activity of the phenolic compounds extracted from our local medicinal plant, *Thapsia garganica* L., and that by doing three types of manipulations, of course, after getting the different plant leaves and roots extracts. First, we quantified the phenolic compounds amounts (total phenolics, flavonoids, and condensed tannins), in order to make a qualitative and a quantitative assessment. Then, we realized the anti-oxidant activity assays such as: the DPPH and ABTS<sup>•+</sup> radical scavenging activity and the reducing power. Our study was fenced by the fractionation and the characterization of the antioxidant activity of the extracts. The experimental results revealed that *Thapsia garganica* L. extracts were rich in total phenolics, showed average content of flavonoids and they exhibited significant condensed tannins amounts. For the antioxidant activity of the plant, the extracts were very good scavengers of DPPH radical. Whereas, the ABTS<sup>•+</sup> radical scavenging activity and the reducing power were low. Finally, analysis of chromatographic profiles of extracts confirmed that the roots and leaves are rich in compounds of low polarity. Moreover, the characterization of the ABTS and DPPH radical scavenging activity of plant extracts showed, once again, that the leaves are more efficient than roots. These observations lead us toward more studies in this field, so that we get more benefits from our local medicinal plants.

**Key words:** *Thapsia garganica* L., free radicals, antioxidants, phenolic compounds, TLC.