

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université ABDRAHMANE MIRA de Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Alimentaires

Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'Etat en
Sciences Alimentaires

Thème

Détermination de l'activité antifongique des extraits méthanoliques de
Thapsia garganica L

Présenté par :

OUTROUNE Souad
RAMINI Zahia

Membres de jury :

Présidente : M^{me} BEDJOU F.
Examinatrices : M^{me} BOUALI N.
M^{me} TAMENDJARI S.
Promotrice : M^{me} OUKIL N.

2011-2012

Remerciements



Au terme de ce modeste travail, nous tenons à exprimer nos remerciements les plus sincères tout d'abord au « Bon Dieu » pour la patience et la santé qui nous ont été utiles tout au long de notre parcours.

Nous tenons à remercier infiniment

- Notre promotrice M^{me} OUKIL N. qui nous a apporté son aide et ses conseils.
- Toute l'équipe du laboratoire de microbiologie générale (Bloc 09)

Il nous est agréable également de remercier les membres de jury

- M^{me} BEDJOU F. pour avoir accepté de présider ce jury et d'apporter ses appréciations sur notre travail.
- M^{me} BOUALI N. et M^{me} TAMENDJARI S. pour avoir accepté d'examiner notre travail.

Enfin, nous remercions profondément toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Merci à tous



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

 *Mes chers parents qui m'ont toujours soutenu. C'est grâce à eux que je suis aujourd'hui au stade final de ma formation.*

 *Ma chère sœur Bahia*

 *Mes chers frères Sofiane et Hakim*

 *Toute ma famille Ramini*

 *Toutes mes amies surtout Fatima, Souad, Hasiba et Kahina*

 *La mémoire de ma très chère amie Hassiba.*

 *A tous ceux qui me sont chers.*

Zahia.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

 *La mémoire de mon père.*

 *Ma très chère mère qui m'a toujours soutenu*

 *Ma chère grand-mère*

 *Ma petite sœur Katia*

 *Mes chers frères Yousef, Moussa, Hamza*

 *Mes oncles, mes tantes, mes cousins, mes cousines*

 *Mes copines Zouzou, Lamia, Kahina, Zahia, Ouezna et Siham*

Souad

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Synthèse bibliographique

Chapitre I: monographie de *Thapsia garganica* L

I.1. L'espèce <i>Thapsia garganica</i> L.....	2
I.2. Classification botanique	2
I.3. Généralités sur la famille des Apiacés	2
I.4. Les caractéristiques des Apiacés.....	3
I.5. Le genre <i>Thapsia</i>	3
I.6. Description botanique de <i>Thapsia garganica</i> L	4
I.7. Répartition géographique de <i>Thapsia garganica</i> L	5
I.8. Composition chimique de <i>Thapsia garganica</i> L.....	5
I.9. Utilisation de <i>Thapsia garganica</i> L	7

Chapitre II: les composés phénoliques.

II.1. Définition	8
II.2. Classification et structure.....	8
II.3. Biosynthèse	10
II.4. Role dans la plante et utilisation humaine	11
II.5. Activités biologiques	12

Partie expérimentale

Chapitre I : Matériel et méthodes

I.1. Matériel végétal.....	15
I.2. Préparation des extraits.....	15
I.3. Dosages colorimétriques.....	16

I.3.1. Dosage des polyphénols totaux.....	16
I.3.2. Dosage des flavonoïdes.....	17
I.3.3. Dosage des tanins condensés (proanthocyanidines)	17
I.4. Etude de l'activité antifongique.....	18
1.4.1. Souches fongiques testées.....	18
1.4.2. Standardisation des inocula.....	19
1.4.3. Dénombrement par la méthode de l'hématimètre.....	19
1.4.4. Préparation des dilutions	20
I.5. Evaluation de l'activité antifongique.....	20
I.6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice.....	21

Chapitre II : Résultats et discussions

II.1. Rendement d'extraction.....	23
II.2. Dosage des polyphénols.....	24
II.2.1. Teneur en polyphénols totaux.....	24
II.2.2. Teneur en flavonoïdes.....	25
II.2.3. Teneur en tanins condensés.....	26
II.3. Activité antifongique.....	27
II.4. Concentration minimale inhibitrice.....	29
Conclusion	31

Références bibliographiques

Annexes

Glossaire

Liste des tableaux

Tableau I : Classification botanique de <i>Thapsia garganica</i> L	03
Tableau II : Description botanique de <i>Thapsia garganica</i> L.....	04
Tableau III : souches fongiques utilisées et leur référence	20
Tableau IV : Résultats de la standardisation des souches testées.....	22
Tableau V : Activité antifongique des extraits méthnoliques de <i>Thapsia garganica</i> L.....	28
Tableau VI : Les CMI des fractions polyphénoliques vis-à-vis des deux souches.....	29

Liste des figures

Figure 01 : Structure de la thapsigargine isolée à partir de <i>Thapsia garganica</i> L.....	06
Figure 02: Structure de l'anneau aromatique des polyphénols.....	08
Figure 03: les voies du biosynthèses des polyphénols	11
Figure 04 : Etapes de préparation des échantillons : Séparation des parties, découpage des racines en rondelles et broyage après séchage.....	15

L'Homme a longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques (**Bahorun, 1997**). Ce n'est qu'à partir du 19^{ième} siècle que les scientifiques ont réussi à isoler les principes actifs tel que les composés phénoliques, responsables de leurs effets, et plus tard à créer des molécules de synthèse dont la plupart de nos médicaments sont issus.

Les substances appartenant au groupe des composés phénoliques, très hétérogènes tant par leur composition que par leur structure, ont été pendant longtemps très mal connues. Considérées comme des substances secondaires, métaboliquement inactives, elles ne suscitaient que peu d'intérêt (**Brzowska et Hanower, 1976**). De nombreuses données épidémiologiques ou expérimentales récemment publiées laissent présumer leur rôle protecteur contre diverses pathologies telles que cancers et maladies cardiovasculaires (**Scalbert et Williamson, 2000**).

Le genre *Thapsia* (famille des Apiacées) est largement répandu à travers la région méditerranéenne. Les Apiacées sont riches en métabolites secondaires et présentent des intérêts économiques et médicaux, comportant des composés secondaires utiles tels que les coumarines, les flavonoïdes, les huiles essentielles et les lactones sesquiterpéniques (**El Kalamouni, 2010**). *Thapsia garganica* L. est largement utilisé dans les pays Nord Africain pour ses propriétés médicinales.

Les données fournies sur les composés phénoliques de cette plante sont rares. Le présent travail a pour objectif, le dosage de quelques composés phénoliques à partir des racines de *Thapsia garganica* L. et la détermination de l'activité antifongiques de ses extraits méthanoliques vis-à-vis de deux souches fongiques appartenant au genre *Aspergillus* (*Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus*).

Chapitre I : Monographie de *Thapsia garganica* L

I.1.L'espèce *Thapsia garganica* L

Thapsia garganica L. est une herbe à souche vivace appartenant à la famille des ombellifères (Raige et al. ,1865 ; Crété, 1965).

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

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

I.2.Classification botanique

La classification de *Thapsia garganica* L. est indiquée dans le tableau I :

Tableau I : Classification botanique de *Thapsia garganica* L. (Guignard, 1989).

Règne	Végétal
Embranchement	Spermaphytes (plantes à graines)
Sous embranchement	Angiospermes (plantes à fleurs)
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Apiales
Famille	Apiacées (Ombellifères)
Genre	Thapsia
Espèce	<i>Thapsia garganica</i> L

I.3.Généralités sur la famille des Apiacées

Les Apiacées comportent 3000 espèces, qui se répartissent dans toutes les régions tempérées. C'est une famille très homogène, une des plus faciles de la flore à reconnaître grâce à ses inflorescences en ombelles. Ce sont essentiellement des herbes annuelles, bisannuelles ou vivaces. Inversement les espèces sont parfois difficiles à distinguer les une des autres (Guignard, 1998).

La valeur alimentaire des Apiacées est généralement faible, mais leur caractère aromatique agréable est très recherché en cuisine (fruit de carvi : *Carum Carvi L*, feuilles de persil: *Petroselinum spp*). La plupart des systèmes de médecines traditionnelles recourent aux Apiacées à des fins curatives **(Bruneton, 2005)**.

Les Apiacées sont parfois toxiques. Leur toxicité est due a lors à des alcaloïdes périphériques (grande ciguë), à des carbures acétyléniques polyinsaturés (ciguë aquatique, œnanthe safranée) ou à des lactones sesquitérpeniques (*Thapsia garganica L*) **(Bruneton, 2005)**.

I.4. Les caractéristiques des Apiacées

L'appareil souterrain pérennant est très varié : racine pivotante, rhizome, tubercule.

La tige est ordinairement cannelée et creuse par manque de développement de la moelle au cours de la croissance, elle est dite fistuleuse.

Les feuilles sont alternes engainantes exstipulées, composées pennées ou palmées ou simples.

Les inflorescences sont organisées en ombelles composées(ou simples) parfois en cymes.

Les fleurs sont blanches ou plus rarement jaunâtres, verdâtres ou rosées, généralement hermaphrodites, mais parfois unisexuelles.

Racine, tige et feuilles sont parcourues par des canaux sécréteurs qui contiennent un mélange d'essences et de résine. Ces canaux expliquent l'odeur forte qui se dégage des Apiacées lors de leur écrasement **(Gaussen, 1982 ; Guignard, 1998)**.

I.5. Le genre thapsia

Thapsia est un genre de plante à fleurs avec 41 espèces, appartenant à la famille des Apiacées. Ils sont originaires d'Afrique, d'Asie et d'Europe.

Thapsia garganica L. est une espèce répandu dans le bassin méditerranéen qui a pour habitat le bord des routes et les champs **(Gomez, 2007 in Berri, 2011)**.

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

La description botanique de *Thapsia garganica L.* est résumée dans le tableau II :

Tableau II : Description botanique de *Thapsia garganica L.*

Description	Image
<p>La racine : épaisse, allongée, remplie d'un suc laiteux, très caustique (Roques, 1835), noire à l'extérieur et blanche à l'intérieur (Lauzer, 1868).</p>	
<p>La tige : est forte, droite, légèrement striée, fistuleuse, haute d'un pied et plus, elle se divise en rameaux lâches, étalés garnis de feuilles (Roques, 1835).</p>	
<p>Les feuilles : pétiolées, aiguës, d'un vert luisant en dessus, plus pâles, nerveuses et ridées en dessous ; les pétioles s'élargissent à leur base en une gaine ample et membraneuse (Roques, 1835).</p>	
<p>Les fleurs : elles sont d'un jaune pâle, forment plusieurs ombelles composées de huit à douze rayons (Roques, 1835).</p>	
<p>Le fruit : elliptique, comprimé par le dos, de 10-15 sur 20-25 mm, à échancrures plus ou moins larges au sommet et à la base. Ailes latérales très développées, brillantes, d'un jaune paille, finement striées (Anonyme 01).</p>	

I.7. Répartition géographique de *Thapsia garganica* L.

Cette plante est très commune, dans tout le nord de l'Afrique, dans le Maroc, l'Algérie, les régences de Tunis et de Tripoli, et, de plus, dans le royaume de Grenade en Espagne, dans les îles Baléares en Italie, en Sicile, en Sardaigne, dans plusieurs îles grecques, et notamment dans celle de Rhodes (Leleux, 1857).

I.8. Composition chimique de *Thapsia garganica* L.

- Composés phénoliques

Djeridane *et al.* (2006) ont révélé que la composition phénolique des extraits éthanoliques de *Thapsia garganica* L. était de 7.63 ± 0.61 mg équivalant d'acide gallique par 1g de matière sèche.

Selon Djeridane *et al.* (2007), l'analyse HPLC des extraits de *Thapsia garganica* L. a révélé que les flavonoïdes représentent 98% des composés phénoliques totaux avec détection de la quercétine, que les dérivés de l'acide hydroxycinnamique représentent 2% des composés phénoliques totaux et que les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque sont inexistantes.

L'étude cytotoxique de substances bioactives extraites de *Thapsia garganica* L. a permis d'isoler des esters de phénylpropanoïdes, connus sous le nom de neohelminthicine A, B, C et D. La différence entre ces composés est l'acyle lié au squelette 1,2 dihydroxy-phénylpropanoïde. Ces acyles sont : angeloyl, octanoyl, hexanoyl et butanoyl qui correspondent respectivement aux neohelminthicines A, B, C et D (Liu *et al.*, 2006).

Le métabolisme des phénylpropanoïdes est un métabolisme secondaire spécifique au règne végétal. Il conduit, à partir de la phénylalanine, à la synthèse d'une grande variété de substances telles que les anthocyanes, les isoflavonoïdes, les stilbènes, des esters d'acides hydroxycinnamiques, ou encore à la lignine. Ces métabolites secondaires interviennent dans la pigmentation florale ou encore la protection des tissus végétaux contre divers stress biotiques et abiotiques (Hoffmann, 2003).

- Autres composés

Le genre *Thapsia* des Apiacées est la source naturelle principale des lactones sesquiterpènes qui appartiennent au groupe des guaianolides, le composant le plus connu est

la thapsigargine (Drew *et al.*, 2011).

La thapsigargine (Tg) est un sesquiterpène lactone de type 6,12-guaianolide et de poids moléculaire de 650 daltons, isolé à partir des racines de *Thapsia garganica* L. La thapsigargine présente une structure complexe avec un noyau tricyclique polyoxygéné à huit centres stéréogènes (figure 01) (Patkar *et al.*, 1979; Rogers *et al.*, 1995).

Ce composé est un inhibiteur puissant des Ca^{2+} -ATPases du réticulum sacro-endoplasmique (SERCA), avec induction d'apoptose cellulaire. Le complexe Tg/SERCA a pu être cristallisé, d'où une meilleure compréhension des principales interactions entre la thapsigargine et l'enzyme. Il a été montré que cette molécule, de part son activité cytotoxique indépendante de la phase du cycle cellulaire, était très active sur les cellules cancéreuses de prostate à développement lent, contrairement aux antimitotiques classiques (Navarrete *et al.*, 2006).

Des expérimentations réalisées ont démontré que la thapsigargine est un stimulant puissant de la libération d'histamine qui est un médiateur chimique des réaction d'hypersensibilité (Patkar *et al.*, 1979).

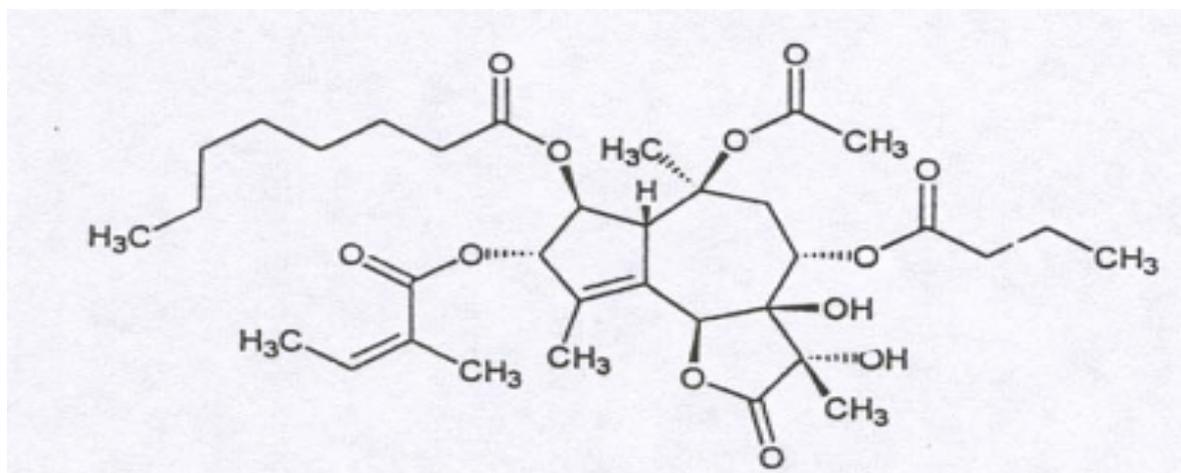


Figure 01 : Structure de la thapsigargine isolée à partir de *Thapsia garganica* L.
(Levine, 2005)

D'autres constituants actifs isolés de *Thapsia garganica* L., les basilolides, une classe originale des dilactones C19, ont induit une mobilisation rapide de calcium intracellulaire dans la lignée à cellule T, toutefois contrairement au thapsigargine, il n'a pas induit l'apoptose

(la mort normale de cellules). Les dilactones C-19 tétracycliques de la même plante ont également montré les propriétés SERCA-inhibantes (**Navarrete et al, 2006**).

I.9.Utilisation de *Thapsia garganica* L.

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 été toujours 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**).

Thapsia garganica L. est une véritable panacée pour les arabes, l'appellent « Le dryas, Bou-nefâ » (le père de l'utile) (**Raige et al. , 1865**).

Le suc extrait à partir de la racine de cette plante agit sur les téguments comme attractif, il forme un topique qui efface les meurtrissures, mais au bout de deux heures d'application l'emplâtre doit être enlevé et l'endroit doit être aussitôt lavé avec de l'eau salée et chaude. Pris à l'intérieur ce suc sollicite le vomissement et purge. Il convient dans les asthmes, les pleurésies chroniques et dans la goutte (**Lauzer, 1868**).

La plante était employée dans certains cas par les médecins mais toujours pour l'usage externe, en cataplasme, contre les pertes temporaires des cheveux ; de même qu'aujourd'hui encore une huile composée de vin, d'huile d'olive, de feuilles de romarin et de racine de thapsia est employée contre les rhumatismes (**Leleux, 1857**).

Reboulleau et Bertherand ont fait connaître, en 1857, une résine vésicante obtenue par l'action de la chaleur sur l'écorce de la racine de *Thapsia garganica* L ; Reboulleau a fait entrer cette résine dans la préparation d'un sparadrap vésicant, qui détermine sur la peau une forte rubéfaction, accompagnée d'une éruption miliaire très intense, analogue à celle qui résulte de l'application de l'huile de *croton tiglium*. Leperdriel en a préparé un taffetas, qui ne détermine pas de vives douleurs, ni le prurit désagréable de l'huile de croton, et qui produit la vésication, lorsqu'il est laissé en contact prolongé avec la peau. De son côté, le pharmacien major Lancelot a obtenu d'excellents effets d'un sparadrap épispastique à la résine de *Thapsia* (**Boullay et al., 1870**).

Chapitre II : les composés phénoliques

II.1.Définition

Les polyphénols constituent le groupe de métabolites le plus large et le plus répandu du règne végétal et font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**).

L'appellation « polyphénols » ou « composés phénoliques » regroupe un vaste ensemble de plus de 8 000 molécules, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (figure 02) (**Hennebelle et al., 2004**).

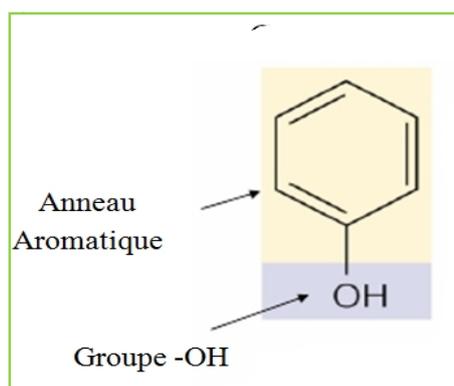


Figure 02: Structure de l'anneau aromatique des polyphénols (**Vermerris et Nicholson, 2006**)

Les polyphénols sont principalement de petites molécules organiques (poids moléculaire typiquement dans la gamme de 200-800 Dalton) avec une ou plusieurs structures phénoliques d'anneau (**Scheepens et al., 2010**).

II.2.Classification et structure

La structure des composés phénoliques va du simple noyau aromatique de faible poids moléculaire jusqu'aux tanins complexes de très haut poids moléculaire, et ils peuvent être classés par le nombre et l'arrangement des atomes de carbone des composants, en fonction de la nature de leur squelette carboné et en fonction de la longueur de la chaîne aliphatique liée

au noyau benzénique (Chira *et al.*, 2008). Les composés phénoliques peuvent être répartis en deux grands groupes : les flavonoïdes et les non-flavonoïdes.

➤ **Les flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques comprenant 15 atomes de carbone formant une structure C6-C3-C6, soit deux noyaux aromatiques reliés par un pont de 3 carbones. Ce sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques (Chira *et al.*, 2008).

- **Les flavonols** : ils sont des composés flavonoïdes largement répandus tels que la myricétine, la quercétine, l'isorhamnétine et le kaempférol sont la plupart du temps présents sous forme d'O-glycosides (Chira *et al.*, 2008).
- **Les flavanones** : ils sont les premiers produits de la voie de synthèse des flavonoïdes.
- **Les flavan-3-ols** : ils sont la catégorie de flavonoïdes la plus complexe. Ces composés vont des simples monomères catéchine et son isomère épicatechine, jusqu'aux oligomères et polymères de proanthocyanidines (Chira *et al.*, 2008).
- **Les flavones** : ils sont structurellement très proches des flavonols, la différence provenant de l'absence de l'hydroxyle en C3 (Chira *et al.*, 2008).
- **Les anthocyanidines** : ils sont largement présents dans le règne végétal, principalement sous formes de glycosides (Chira *et al.*, 2008).

➤ **Les non-flavonoïdes**

Les principaux non-flavonoïdes d'importance alimentaire sont les acides phénoliques, les acides hydroxycinnamiques et les stilbénes (Chira *et al.*, 2008).

- **Les phénols simples** : Ce sont des dérivés en C6 du noyau benzénique, rares à l'état naturel et issus de la décarboxylation de l'acide shikimique. On trouve parmi les phénols simples l'hydroquinol, le pyrocatechol et le phloroglucinol (Chira *et al.*, 2008).
- **Les acides phénoliques**

Les acides hydroxybenzoïques : ils présentent une structure en C6-C1, composée d'un noyau benzénique sur lequel vient s'attacher une chaîne aliphatique à un carbone.

Les acides hydroxycinnamiques : les acides hydroxycinnamiques communs sont les acides caféique, p-coumarique, férulique et sinapique.

Les stilbènes : Ce sont des composés polyphénoliques qui ont une structure C6-C2-C6, deux noyaux benzéniques reliés par un pont méthylène (**Chira et al., 2008**).

II.3. Biosynthèse des polyphenols

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des plantes. Ils sont synthétisés à partir de trois voies biosynthétiques :

II.3.1. La voie de shikimate :

C'est souvent la voie de biosynthèse des composés aromatiques, elle joue un rôle important pour contrôler le métabolisme de la voie de phénylpropanoïde (**Kening et al., 1995 in Zeghad, 2009**). Elle conduit à la formation de phénylalanine qui par désamination donne le précurseur immédiat des phénols (**Manchado et Cheynier, 2006**).

II.3.2. La voie de phénylpropanoïde:

La voie de phénylpropanoïde commence par la phénylalanine (Phe) qui fournit en plus des principaux acides phénoliques simples, coumarines, isoflavonoïdes, flavonoïdes, acide salicylique, des précurseurs de lignine, qui est quantitativement le second biopolymère le plus important après la cellulose (**Hoffmann et al., 2004**).

II.3.3. La voie de biosynthèse des flavonoïdes :

La diversité structurale des composés polyphénoliques, due à cette double origine biosynthétique est encore accrue par la possibilité d'une participation simultanée des deux voies dans l'élaboration de composés d'origine mixte, les flavonoïdes (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**).

Les différentes étapes de la biosynthèse des composés phénoliques sont résumées dans la (figure 03).

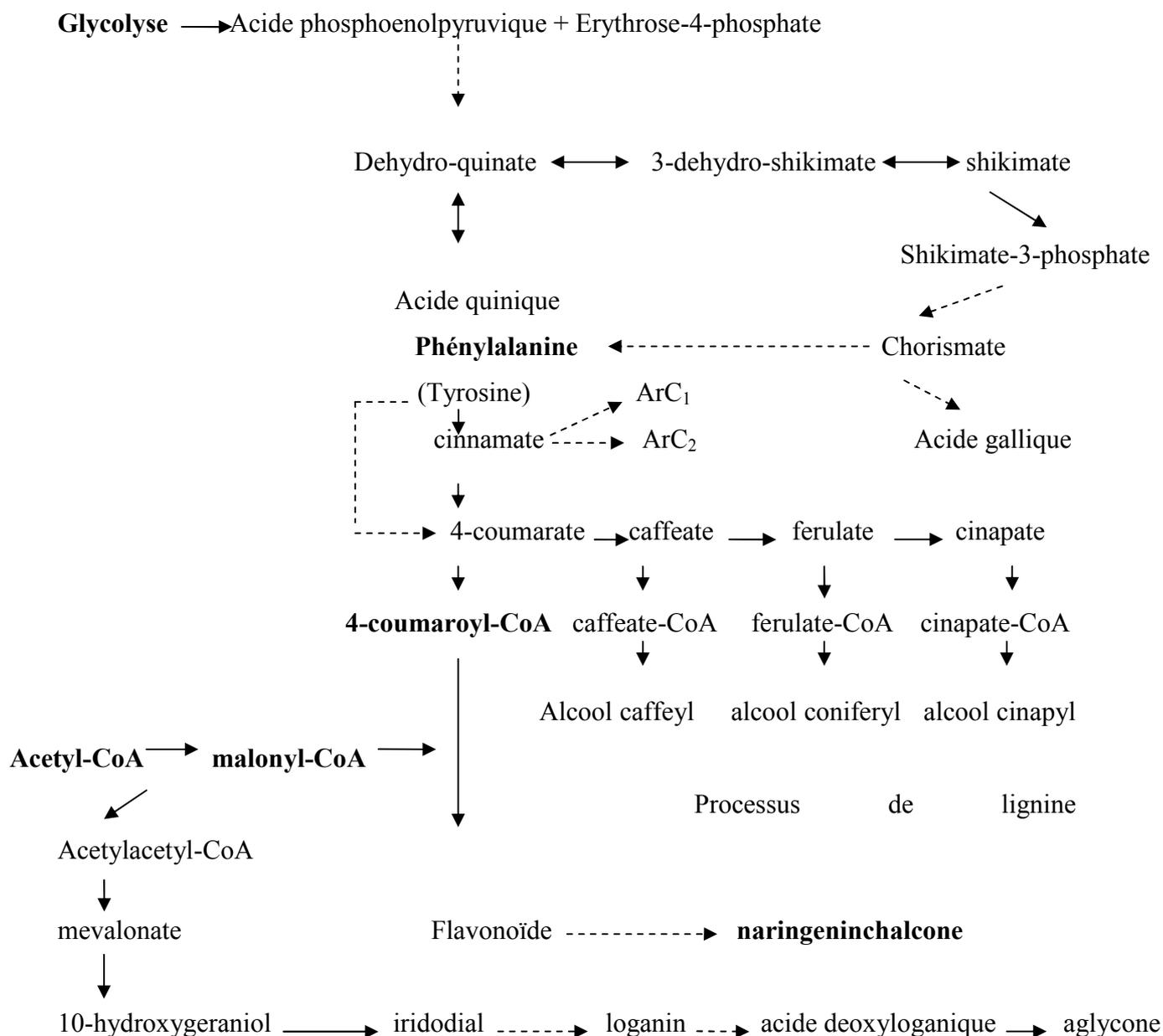


Figure 03: les voies du biosynthèses des polyphénols (Ryan et al., 2002)

II.4. Rôles des composés phénoliques dans la plante et utilisation humaine

Le rôle des composés phénoliques est maintenant reconnu dans différents aspects de la vie de la plante et dans l'utilisation que fait l'Homme des végétaux. Ils peuvent en effet intervenir :

- Dans certains aspects de la physiologie de la plante (lignification, régulation de la croissance, interactions moléculaires avec certains microorganismes symbiotiques ou parasites...).
- Dans les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (relations avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux UV), soit directement dans la nature soit lors de la conservation après récolte de certains végétaux.
- Dans les critères de qualité (couleur, astringence, amertume, qualité nutritionnelle...) qui orientent les choix de l'Homme dans sa consommation des organes végétaux (fruits, légumes, tubercules,...) et des produits qui en dérivent de leur transformation.
- Dans les variations de certaines caractéristiques des végétaux lors des traitements technologiques (préparation des jus de fruits, des boissons fermentées...) pendant lesquelles apparaissent fréquemment des brunissements enzymatiques qui modifient la qualité du produit fini.
- Dans la protection de l'Homme vis-à-vis de certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leur propriétés anti oxydantes (**Macheix *et al.*, 2005**).
- Dans les éventuels bénéfices que pourraient apporter à la santé humaine ; les polyphénols intéressent particulièrement deux domaines : la phytothérapie – puisque l'explication de l'efficacité supposée de nombreuses plantes médicinales repose en tout ou partie sur la présence de composés phénoliques dans ces plantes – et l'hygiène alimentaire, de plus en plus d'études indiquent que les polyphénols pourraient diminuer le risque de survenue d'un certain nombre de pathologies, en particulier celles liées au vieillissement et aux lésions oxydatives (cancers, maladies cardiovasculaires ou neurodégénératives) (**Hennebelle *et al.*, 2004**).

II.5. Les activités biologiques des polyphénols

II.5.1. Activité antioxydante

L'attention des chercheurs a été attirée par le fait que, par leur nature même, les composés à fonction phénolique présentent une activité antioxydante. L'intérêt pour des substances présentant ce type de propriétés est loin d'être récent, puisqu'elles sont depuis

longtemps exploitées dans l'industrie agroalimentaire en tant que conservateurs pour empêcher notamment le rancissement des matières grasses (**Hennebelle *et al.*, 2004**).

II.5.2. Propriétés antiallergiques

Ces effets antiallergiques sont attribués à l'influence des flavonoïdes sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes, telles que l'AMP cyclique et ATPase Ca²⁺ dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des monocytes et des basophiles. Par exemple, l'ATPase Ca²⁺ dépendante dégrade l'ATP produisant ainsi de l'énergie afin de faciliter le transfert du calcium à travers les membranes cellulaires, ce qui favorise la libération de l'histamine stockée dans les vésicules. En inactivant cette enzyme, la quercétine a montré un potentiel d'action supérieur à celui du cromoglycate de sodium utilisé comme médicament en empêchant la libération de l'histamine et d'autres substances endogènes qui causent l'asthme (**Marfak, 2003**).

II.5.3. Propriétés anticancéreuses

Des recherches expérimentales suggèrent que les flavonoïdes sont parmi les substances susceptibles de retarder voire d'empêcher l'apparition de certains cancers, tout en réduisant d'une manière spécifique les risques d'en avoir chez les sujets humains (**Decloitre, 1993 ; Hertog, 1996 in Zeghad, 2009**).

II.5.4. Activité anti-inflammatoire

In vitro, plusieurs flavonoïdes sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique plaquettaire. C'est ainsi que la myricétine et la quercétine bloquent l'action des cyclo-oxygénase et lipoxygénase à des concentrations relativement élevées. À faibles concentrations, c'est la lipoxygénase qui est inhibée préférentiellement. Certains travaux suggèrent qu'ils posséderaient une bonne activité anti-inflammatoire sans les effets indésirables de type ulcérogène (**Ghedira, 2005**).

II.5.5. Activité antimicrobienne

Les propriétés antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Une grande partie des recherches actuelles porte sur l'étude de molécules antimicrobiennes comme les polyphénols (**Athamena *et al.*, 2010**).

Il y a une évidence que les composés phénoliques ont des effets sur la santé humaine, leur utilisation comme un antiseptique peut être la plus vieille application médicinale en raison de ses effets secondaires négatifs sur les tissus vivants (**Vermerris et Nicholson, 2006**).

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhésines microbiens, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (**Cowan, 1999**).

II.5.5.1. Activité antifongique

A l'heure actuelle, la thérapeutique des mycoses superficielles dispose d'une gamme de substances chimiques actives sur les champignons pathogènes. Cependant, le prix des spécialités à base d'antifongiques de synthèse reste relativement élevé. De telle sorte que malgré l'arsenal thérapeutique disponible, la majeure partie de la population a recours à la médecine et pharmacopée traditionnelles (**Kambou, 1999**).

Certaines plantes produisent des substances efficaces contre certaines souches résistantes aux produits de synthèse par l'aptitude d'inhibition de la germination des spores, c'est le cas de cinnaldehyde et salicylaldehyde qui a une activité contre *Fusarium sp*, résistante vis-à-vis des fongicides synthétiques (**Young-Cho et al., 2007**).

Les composés phénoliques des plantes ont été également suggérés pour prévenir les effets défavorables que les toxines fongiques ont sur la santé humaine, aussi bien que servir dans leur désintoxication. Le chlorophorin de stilbène était le composé le plus efficace dans l'inhibition de la croissance fongique et dans la réduction de production de toxines (**Vermerris et Nicholson, 2006**).

II.5.2. Activité antibactérienne

Les agents antiseptiques modernes efficaces contre la bactérie *Staphylococcus aureus*, cependant, sont encore comparés à une solution de 5% du phénol. Le phénol est encore employé comme anesthésique oral dans des pastilles de gorge, à concentration typique de 1.4% (**Vermerris et Nicholson, 2006**).

Chapitre I : matériel et méthodes

I.1. Matériel végétal utilisé

Le prélèvement des échantillons a été effectué au niveau d'Adekar (Commune de Beni K'sila Village Bezit), pendant la période d'hiver (décembre 2011).

Après la récolte, les racines de la plante sont séparées des tiges et sont ensuite bien lavés pour les débarrasser de la terre, et découpées en rondelles (figure 04).

- **Séchage** : un premier séchage est effectué à l'air libre et à l'abri de la lumière et un deuxième séchage est effectué dans l'étuve à 40°C.
- **Broyage** : les racines séchées sont broyées à l'aide d'un broyeur jusqu'à l'obtention d'une poudre qui sera ensuite tamisée (figure 04).
- **Tamissage** : après broyage la poudre obtenue est tamisée à l'aide d'un tamiseur jusqu'à l'obtention d'une fine poudre qui sera utilisée dans les analyses effectuées.



Figure 04 : Etapes de préparation des échantillons : Séparation des parties, découpage des racines en rondelles et broyage après séchage.

I.2. Préparation des extraits

Pour l'extraction des polyphénols plusieurs méthodes ont été développées. Dans notre travail une extraction par solvant est réalisée selon le protocole de **Djeridane et al., (2006)** avec quelques modifications, en utilisant l'éthanol aqueux à 96% comme solvant. Le taux d'extraction est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'extraction} = [(P_0 - P_1) / P_E] \times 100 .$$

Avec :

P₀ : Poids du bécher vide (g) ;

P₁ : Poids du bécher après évaporation du solvant ;

P_E : Poids de l'échantillon (poudre) (g) (**Owen et Johns, 1999**).

➤ **Protocole d'extraction**

1g de poudre est dissous dans 50ml d'éthanol à 96%. Les solutions sont agitées pendant 24heures au moyen d'une plaque agitatrice à température ambiante. Après centrifugation (2900 tours/min) pendant 5 minutes et filtration avec du papier filtre standard, le filtrat obtenu est soumis à l'évaporation dans l'étuve à 40°C jusqu'à l'évaporation complète du solvant. L'extrait est reconstitué à une concentration de 50mg/ml, dans le méthanol pur et conservé dans des flacons à 4°C pour empêcher l'action de polyphénoloxydases qui dégradent les composés phénoliques.

I.3. Dosage colorimétriques

I.3.1. Dosage des polyphénols totaux dans l'extrait

➤ **Principe**

D'après **Ribereau-Gayon(1968)** plusieurs recherches ont montré que les composés phénoliques réagissent avec le réactif folin–Ciocalteu. Le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximale est comprise entre 725 et 750 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'extrait végétal (**Boizot et Charpentier, 2006**).

➤ **Mode opératoire**

Selon le protocole modifié de **Skerget et al., (2005)**, 1,25 ml de réactif Folin-Ciocalteu dilué à 1/10 avec de l'eau distillée est ajouté à 0,25 ml d'extrait dilué dans le méthanol à 1/100 dans le méthanol. Après 2minutes, 1 ml de Na_2CO_3 (7,5%) est ajouté. Le tube de réaction est incubé pendant 5minutes à 50°C dans un bain marie, puis refroidis rapidement dans la glace. Le témoin est préparé dans les mêmes conditions, en remplaçant le volume

d'extrait par le méthanol. L'absorbance est mesurée à 760nm. Une courbe d'étalonnage standard (Annexe III) est réalisée avec l'acide gallique. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g matière sèche).

1.3.2. Dosage des flavonoïdes

➤ **Principe**

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle(OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO, un complexe en présence de chlorure d'aluminium. Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium). Ces complexes peuvent être utilisés pour la réalisation de spectres d'absorption de nombreux composés phénoliques des végétaux (**Ribereau-Gayon, 1968**).

➤ **Mode opératoire**

Le protocole suivi est celui de **Djeridane et al., (2006)**, un volume de 1ml de AlCl₃ (2%) a été mélangé à un volume égal d'extrait dilué à 1/100 dans le méthanol. Après 15 minutes d'incubation à l'obscurité, les absorbances sont mesurées à 430 nm à l'aide d'un spectrophotomètre contre une courbe étalon préalablement tracée avec la quercétrine comme standard. Pour chaque échantillon, un témoin est préparé en remplaçant l'extrait par du méthanol.

1.3.3. Dosage des tannins condensés (proanthocyanidines)

➤ **principe**

Un dosage colorimétrique permet de détecter le clivage oxydatif des proanthocyanidines par le sulfate ferreux. Cette méthode consiste en une dépolymérisation oxydante des tannins qui forme des anthocyanes, catalysée par l'acide chlorhydrique (HCl). Ces anthocyanes sont colorés, ce qui permet une quantification des tannins par spectrométrie. Les liaisons 4-6 sont plus résistantes que les liaisons 4-8. La quantité d'anthocyanes formée varie en fonction du type de liaisons 4-6 ou 4-8 présentes dans les tannins. Le nombre de groupements alcool sur les cycles A et B change l'absorption de l'anthocyane. Cette méthode est globale et ne donne aucune information sur la composition des tannins. Toutefois c'est un outil indispensable pour la quantification globale des tannins condensés (**Pellau, 2008**).

➤ **Mode opératoire**

Le protocole utilisé dans ce cas est celui de **Vermeris et Nicholson, (2006)**, on ajoute 2,5 ml d'acide de sulfate ferreux (77mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dissous dans 500 ml de 2 :3 HCl/ n-butanol) à 0,25 ml d'extrait dilué à 1/10 dans le méthanol. Les tubes sont placés dans un bain marie à 95°C pendant 15minutes. L'absorbance est mesurée à 530nm. La concentration des proanthocyanidines est exprimée en équivalent de la cyanidine. Le coefficient d'extinction molaire ϵ qui est utilisé pour convertir les valeurs d'absorption à des concentrations est égal à 34700L/mol.cm. La loi de Beer-Lambert :

$A = \epsilon \cdot l \cdot c$ est employée pour déterminer les concentrations en tannins condensés

$$C = \frac{A \cdot Mm}{\epsilon l} \text{ mg/ml}$$

C : la concentration de proanthocyanidines en mg/ml ;

ϵ : coefficient d'extinction molaire de la cyanidine en L/mol.cm ;

Mm : masse molaire de la cyanidine (égale à 287.24 g/mol) ;

l : la largeur de cuve en cm.

I.4. Etude de l'activité antifongique

I.4.1. Souches fongiques testées

Les extraits méthanoliques de la plante *Thapsia garganica* L. ont été testés vis-à-vis de deux souches fongiques qui font partie d'un groupe de microorganismes appartenant au genre *Aspergillus* qui sont des pathogènes contaminants. Il s'agit d'*Aspergillus Niger* et *Aspergillus flavus*. Ces souches sont fournies par le laboratoire de microbiologie appliquée de l'université Abderrahmane Mira. Elles ont été repiquées sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar) et incubées à l'étuve à 30°C. Le tableau III montre les souches fongiques testées et leurs références.

Tableau III : souches fongiques utilisées et leur référence.

Souches	Références
<i>Asprgillus niger</i>	2CA 936
<i>Aspergillus flavus</i>	NRRL 391

1.4.2. Standardisation des inocula

Suivant le protocole modifié de **Rodriguez-Tudela *et al*, (2003)**, les inocula sont préparés à partir de cultures fongiques fraîches et mûres âgées de 2 à 5 jours cultivées sur milieu PDA dans des boîtes de Pétri à une température de 30°C. Les cultures fongiques ont été couvertes de 5ml d'eau distillée stérile contenant 0.1% de Tween 20 puis des petits mouvements sont effectués afin d'homogénéiser les spores. Les suspensions de spores ont été transférées dans des tubes stériles, et homogénéisées pendant 15minuts à l'aide d'un Vortex. Puis diluées et ajustées jusqu'à l'obtention d'un inoculum de 1.10^6 à 5.10^6 conidies/ml. La densité optique de la suspension sporale obtenue a été mesurée à la longueur d'onde 530nm.

1.4.3. Dénombrement par la méthode de l'hématimètre

➤ *Technique de numération des spores*

La numération des spores est la détermination du nombre de spores contenues dans un volume précis de milieu liquide. On exprime le résultat de la numération en concentration de spores, c'est-à-dire en nombre de spores par millilitre.

La numération des spores est réalisée directement par comptage au microscope optique, à l'aide d'une cellule de numération (Cellule de Malassez).

Lorsque la suspension sporale est trop concentrée, il est nécessaire de réaliser une dilution préalable.

➤ *Les différentes étapes*

- Observer à l'objectif $\times 10$ pour repérer la position du quadrillage, et vérifier l'homogénéité de la répartition des spores à compter ;
- Observer en suite à l'objectif $\times 40$ pour réaliser le comptage.

- Compter les spores contenues dans un carré.
- Le nombre de spores par millilitre est donné par la formule suivante :

$$N = n \times D \times 100$$

N : nombre de spores trouvées ;

D : taux de dilution ;

n : nombre de spores trouvées dans un carré ;

100 : nombre de carrés constituant la cellule.

Les inocula ont été standardisés et les résultats obtenus sont résumés dans le tableau IV.

Tableau IV : Résultats de la standardisation des souches testées

Souches	Absorbances à 530nm	Nombre de spores par ml
<i>Aspergillus niger</i>	1,341	4,20. 10 ⁶
<i>Aspergillus flavus</i>	1,339	4,65. 10 ⁶

I.4.4. Préparation des dilutions des extraits

Afin d'évaluer l'activité antifongique des extraits obtenus, des dilutions de 1/1 (solution mère), 1/2, 1/4 et 1/8 ont été préparées dans de l'eau physiologique. Elles correspondent à des concentrations de 50 mg/ml, 25mg/ml, 12,5mg/ml, 6,25mg/ml respectivement.

I.5. Evaluation de l'activité antifongique

➤ *Principe*

La méthode repose sur la diffusion de l'extrait à partir des disques chargés et déposés sur milieu solide, préalablementensemencé par écouvillonnage avec une suspension fongique. L'extrait diffuse à partir du disque en créant un gradient de concentration faisant apparaître une zone claire (Nitarajan *et al.*, 2005). Plus la zone d'inhibition est grande, plus la sensibilité de la souche est forte.

➤ **Mode opératoire**

Le protocole suivi est celui de **Karabay-Yavasoglu et al.(2007)** modifié, des disques de papier wattman N°1 (6mm) déposés à la surface de géloses Muller-Hinton préalablement ensemencés par écouvillon stérile à partir d'une suspension de souche test, sont imbibés de 20µl d'extrait à différentes concentrations correspondant aux dilutions (1/1, 1/2, 1/4 , 1/8). Les boîtes de Pétri sont mises au réfrigérateur à 4°C pendant 3heures pour une pré-diffusion (**Bansemir et al., 2006**). Des zones d'inhibition autour des disques sont mesurées en millimètres après incubation à 30°C pendant 48 heures (**Burt et Reinders, 2003**).

Préparation d'un témoin négatif en imprégnant des disques témoins avec 20µl de l'eau physiologique.

Les différentes étapes de ce test sont les suivantes :

- La gélose Muller-Hinton est coulée dans des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre.
- Un ensemencement par écouvillonnage est réalisé après solidification de la gélose pour avoir un tapis homogène des colonies après incubation.
- Les boîtes inoculées sont séchées à l'étuve pendant 20minutes à 30°C.
- Des disques de papier wattman N°1 ont été préparés, stérilisés et déposés à l'aide d'une pince stérile à la surface du milieu ensemencé puis imprégnés des différentes dilutions préparés à partir de l'extrait (20µl).
- Pour chaque souche, un disque témoin est utilisé et imprégné par 20µl d'eau physiologique.
- Les boîtes sont mises au réfrigérateur à 4°C/3h pour une pré-diffusion des solutions d'extrait à tester.
- L'incubation des boîtes a eu lieu à l'étuve à 30°C.
- Après 48 heures les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés.

I.6.Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

➤ **Principe**

Elle permet de déterminer la plus petite concentration capable d'inhiber la croissance de souche microbienne considérée (concentration minimale inhibitrice ou CMI). La méthode par diffusion en gélose fondée sur des gradients de concentration, c'est la méthode manuelle la

plus couramment utilisée. Elle est fondée sur le fait qu'un disque imprégné d'extrait et déposé sur une gélose nutritive, préalablement inoculée par la suspension à tester, va diffuser suivant un gradient de concentration, et que la souche ne se développera pas en présence de concentrations égales ou supérieures à la concentration minimale inhibitrice.

➤ *Mode opératoire*

Le procédé emploie des disques de 6 millimètres de diamètre dont le papier a été imprégné d'extrait à différentes dilutions (1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64).

A partir d'une suspension de spores, on inocule de manière standardisée la gélose nutritive Muller-Hinton. On dépose ensuite sur cette gélose des disques imprégnés d'extrait à différentes dilutions, qui va libérer un gradient progressivement décroissant d'extrait au fur et à mesure de l'éloignement du disque (diffusion centrifuge).

Après incubation à 30°C pendant 48 heures, on peut observer des zones circulaires d'inhibition autour des disques dont les diamètres (plus ou moins grands suivant la sensibilité de la souche) seront mesurés (**Hayette et al., 2010**). La CMI est déterminée à partir de la plus petite concentration dont une inhibition est apparue.

Chapitre II : Résultats et discussion

II.1. Rendement d'extraction

Le rendement ou le taux d'extraction est de $9,48 \pm 0,15\%$, cette valeur est très inférieure à celle trouvée par Gali et Hammadache dans leur travail effectué l'année 2011 sur la même plante en utilisant comme solvant l'éthanol 70% ($17,62 \pm 0,9\%$), cette différence peut être due:

Au solvant d'extraction utilisé, l'éthanol 70% est meilleur pour l'extraction.

A la récolte des échantillons qui est effectuée au mois de mars, on constate que la période de récolte a une influence sur le rendement de l'extraction.

Une comparaison avec le travail de Gali et Hammadache montre que les feuilles représentent la partie qui donne un rendement d'extraction le plus élevé par rapport aux racines.

Le rendement d'extraction dépend du solvant et de la méthode d'extraction ; la méthode d'extraction doit permettre une extraction complète des composés d'intérêt et elle doit éviter la modification chimique (**Turkmen *et al.*, 2006 ; Hayouni *et al.*, 2007**).

Les variations des rendements d'extraction peuvent être attribuées à la différence de solubilité des composés phénoliques dans les solvants d'extraction. D'ailleurs, le degré de polymérisation de ces composés et leurs implications dans d'autres structures moléculaires induit à la formation des complexes insolubles (**Falleh *et al.*, 2008**).

A côté de la méthode d'extraction, d'autres facteurs peuvent influencer l'efficacité de l'extraction des polyphénols dont on cite :

- la nature du solvant utilisé :

Différents systèmes de solvants ont été utilisés pour l'extraction des polyphénols à partir des plantes médicinales. L'eau et les mélanges aqueux de l'éthanol, de méthanol, et de l'acétone sont communément utilisés dans l'extraction des polyphénols.

Wang et Helliwell (2001) considèrent que l'éthanol aqueux est meilleur que le méthanol et l'acétone pour l'extraction des flavonoïdes de thé. Néanmoins, dans un autre travail, l'eau s'est avéré être le meilleur solvant pour l'extraction des catéchines de thé que le méthanol 80% ou l'éthanol 70% (**Turkmen *et al.*, 2006 ; Hayouni *et al.*, 2007**).

- Le nombre d'extractions et le volume du solvant utilisé : dans l'extraction des polyphénols, une seule extraction est insuffisante comparé à une extraction multiple (**Turkmen et al., 2006 ; Hayouni et al., 2007**).
- Le pH du milieu d'extraction ainsi que la température (**Vatai et al., 2009**).
- La taille et la forme des particules : produit bien homogénéisé.
- Le temps d'extraction (**Turkmen et al., 2007**).

II.2.Dosage des polyphénols

II.2.1.Teneur en polyphénols totaux

Le résultat est exprimé en mg équivalent d'acide gallique par 1g de matière sèche (mg EAG/g MS) : $1,20 \pm 0,10$ mg EAG/g MS.

Une couleur bleue apparaît après 5 minutes d'incubation à 50°C confirmant la présence des polyphénols qui ont réduit le réactif de Folin-Ciocalteu. L'intensité de la couleur qui varie entre le bleu clair et le bleu foncé est fonction de la teneur en polyphénols (**Boizot et Charpentier, 2006**).

Dans une étude effectuée par **Djeridane et al. (2006)**, sur l'activité antioxydante des extraits de quelques plantes médicinales algériennes, dont *Thapsia garganica* L. une mesure de la teneur en polyphénols totaux de cette plante, en utilisant l'éthanol 70% comme solvant d'extraction, a fourni une valeur de $7,63 \pm 0,61$ mg EAG/g MS. Cette valeur est supérieure à la valeur obtenue dans notre travail avec les racines ($1,20 \pm 0,10$ mg EAG/g MS). Cela est peut être du à :

La différence de solvant d'extraction ; dans notre travail on a utilisé pour l'extraction l'éthanol 96%, cela indique que l'éthanol 70% est meilleur pour l'extraction que l'éthanol 96%.

La région de la récolte, **Djeridane et al. (2006)** ont récolté les plantes à partir de différents endroits autour de la ville de Laghouat (sud algérien). Les conditions climatiques difficiles (température élevée, exposition longue au soleil, sécheresse, et une courte durée de croissance) entraînent l'augmentation du synthèse des polyphénols (**Djeridane et al., 2006**), contrairement à notre plante qui a été récoltée au nord algérien dans une région dont les conditions climatiques différent de celles du sud (température moyenne, humidité ...).

La période de récolte, les plantes ont été cueillies en Juin pour **Djeridane et al. (2006)**, et en Décembre pour notre plante.

La synthèse des polyphénols est plus importante dans les plantes qui sont exposées aux facteurs environnementaux stressants (sécheresse, polluants,...) (**Cannac et al., 2007**).

Dans un autre travail effectué par **Djeridane et al. (2007)**, une évaluation de la teneur en polyphénols totaux réalisée sur les parties aériennes de quelques plantes algériennes, dont *Thapsia garganica* L., utilisant l'éthanol 80% comme solvant d'extraction, a donné une valeur de 2,5 mg EAG/ g MS qui est une valeur supérieure à celles qu'on a obtenu pour les racines (1,20±0,10 mg EAG/g MS). Cela peut s'expliquer par l'augmentation de la concentration de l'éthanol (diminution de la polarité de solvant).

Les feuilles représentent une teneur plus élevée que les racines. On peut expliquer ce résultat par le fait que les feuilles sont le siège principale de la synthèse de ces métabolites (**Del Rio et al., 2003**). Selon **Škerget et al. (2005)** le rendement en polyphénols totaux est plus important dans les feuilles que dans les racines, et ceci s'explique par le fait que les polyphénols sont plus présents dans les cellules photosynthétiques. En plus de leur rôle protectif de la plante (protection contre les herbivores et contre les radiations ultraviolets) ainsi que l'attraction des pollinisateurs et leur implication dans le support structural (**Borchardt et al., 2008**) ces métabolites se trouvent beaucoup plus dans les parties aériennes (feuilles, tige et les fleurs). Diverses études ont montré des résultats similaires dans d'autres plantes: aubépine (**Bahorun, 1997**).

II.2.2. Teneur en flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes exprimée en mg Equivalent de Quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g MS) : 0,043±0,032 mg EQ/g MS.

Les flavonoïdes sont les représentants les plus nombreux et les plus connus des polyphénols (plus de 5 000 molécules isolées) (**Hennebelle et al., 2004**). Chez *Thapsia garganica* L., ils constituent 98% des polyphénols totaux des parties aériennes (**Djeridane et al., 2007**). Tandis que les racines ont fourni de très faibles teneurs. La richesse des feuilles en flavonoïdes peut être attribuée à leur rôle important dans la protection contre les rayonnements solaires (**Ryan et al., 2002**).

La différence dans les polarités des solvants d'extraction influence la solubilité des constituants chimiques d'un échantillon ainsi que le rendement d'extraction, c'est pourquoi, le choix d'un bon système de solvant est l'étape la plus décisive pour l'obtention d'une bonne

teneur en composés phénoliques, en flavonoïdes ou tout autre composé, à partir d'un échantillon donné (**Sulaiman et al ., 2011**)

Selon **Djeridane et al. (2006)**, la teneur en flavonoïdes de *Thapsia garganica* L. est estimée à $4,04 \pm 0,42$ mg ER/g MS (mg équivalent de Rutine par g de matière sèche). Par rapport à cette valeur notre résultat obtenu avec l'éthanol 96% ($0,043 \pm 0,032$ mg EQ/g MS) est très inférieur. Cette variation est due à la différence de la région, la saison de la récolte et le solvant d'extraction utilisé. L'éthanol 70% est le solvant le plus performant pour l'extraction des flavonoïdes à partir de *Thapsia garganica* L.

Dans une étude réalisée par **Sulaiman et al. (2011)** sur la partie aérienne d'une plante de la même famille que *Thapsia garganica* L : le céleri (*Apium graveolens*). La teneur en flavonoïdes obtenue est de $0,8 \pm 0,1$ mg EQ/g MS pour l'éthanol 70%.

II.2.2.Teneur en tannins condensés

Les tannins sont des métabolites secondaires présents dans de nombreuses plantes ligneuses et herbacées. Ils sont localisés dans les différents organes : tiges, feuilles, fruits ou graines. Les conditions environnementales influent sur la teneur en tannins des plantes : un ensoleillement important et un sol peu fertile favorisent la synthèse des tannins par les plantes (**Zimmer et Cordesse, 1996**). Les tanins se rencontrent dans la plupart des plantes mais souvent en très faible quantité, parfois même à l'état de trace .Cependant, certaines espèces accumulent dans certains de leurs organes des tannins en grande quantité (**Binet et Brunel, 1968**).

Le résultat obtenu indique que la teneur des racines de *Thapsia garganica* L. en tannins condensés est très faible ($0,0096 \pm 0,0005$ mg/ml). On remarque une grande différence entre cette valeur et celle trouvée par Gali et Hammadache dans leur travail effectué sur la même plante ($1,38 \pm 0,36$ mg EAT /g MS), cela peut s'expliquer par : la différence entre les méthodes de la détermination de la teneur en tannins. Dans leur travail la méthode appliquée est basée sur la précipitation de la protéine BSA (Sérum Albumine Bovine), décrite par **Hagerman et Butler (1978)**, on constate que cette méthode est meilleure que celle qu'on a appliquée, en plus selon **Adamczyk et al, (2008)** les tanins sont des polyphénols polymériques qui ont la capacité de précipiter les protéines , la différence des solvants d'extraction utilisés, et la période de récolte qui est le mois de Mars pour Gali et

Hammadache dont la plante était dans un stade de croissance développé par contre notre plante a été récoltée dans un stade précoce de croissance.

Dans le travail effectué par Gali et Hamamdache, une évaluation de la teneur en tannins réalisée sur les feuilles a donné une valeur de $2,79 \pm 0,45$ mg EAT/g MS, en comparant cette valeur à celle trouvée dans le présent travail sur les racines on constate que les tannins sont plus abondants dans les feuilles. Selon **Akroum, (2006)** les tanins condensés, se forment par la polymérisation des flavonoïdes qui est peut être à l'origine de leur teneur élevée dans les feuilles. Les tannins jouent aussi un rôle important dans la protection de la plante contre les herbivores et les infections et sont impliqués dans la maturation des fruits et des graines (**Amory et Schubert, 1987**).

II.3. Activité antifongique

Pendant plusieurs années, des fongicides synthétiques ont été utilisés contre les fongiques pathogènes. Cependant leur utilisation considérable a mené au développement de la résistance, et afin de surmonter ce problème, des concentrations élevées ont été utilisées, mais cela a augmenté le risque de formation de résidus toxiques à partir de ces produits chimiques. Pour cette raison plusieurs études ont été réalisées sur la possibilité d'utilisation de métabolites secondaires des plantes, tel que les composés phénoliques (**Marei et al., 2012**).

Dans la présente étude, les extraits méthanoïques de *Thapsia garganica* L. sont testés vis-à-vis de deux souches appartenant au genre *Aspergillus* (*Aspergillus Niger* et *Aspergillus Flavus*). Les résultats sont exprimés selon trois niveaux d'activité : résistant : $D < 8$ mm, intermédiaire : $8\text{mm} \leq D \leq 15\text{mm}$ et sensible : $D > 15\text{mm}$ (**Bansemir et al., 2006**). L'activité antifongique des extraits méthanoliques est résumée dans le tableau V.

Tableau V : Activité antifongique des extraits méthanoliques de *Thapsia garganica* L.

Dilutions	Diamètres des zones d'inhibition (mm)	
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
SM (50mg/ml)	$11,62 \pm 0,57$	$11,66 \pm 1,52$
1/2 (25mg/ml)	$11,33 \pm 0,57$	$11,00 \pm 1,00$
1/4 (12,5mg/ml)	$11,00 \pm 1,00$	$10,33 \pm 0,57$
1/8 (6,25mg/ml)	$10,33 \pm 0,57$	$10,00 \pm 1,00$

L'évaluation de l'activité antifongique varie d'une souche à une autre et d'une concentration à une autre.

Les résultats obtenus pour *Aspergillus niger* varient entre $10,33 \pm 0,57$ mm et $11,62 \pm 0,57$ mm, on remarque une petite différence entre les diamètres des zones d'inhibition pour toutes les dilutions effectuées dont la plus grande zone est enregistrée avec la solution mère.

Pour *Aspergillus flavus* on remarque que les diamètres des zones d'inhibition diffèrent légèrement d'une dilution à une autre, ils varient entre $10,00 \pm 1,00$ mm et $11,66 \pm 1,52$ mm. A chaque fois que la concentration de l'extrait diminue le diamètre de la zone d'inhibition devient plus petit.

Les valeurs obtenues pour les deux souches sont comprises entre $10,00 \pm 1,00$ mm et $11,66 \pm 0,57$ mm donc selon **Bansemir et al., 2006**, on peut dire que *Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus* présentent une sensibilité intermédiaire vis-à-vis les extraits méthanoliques de *Thapsia garganica* L.

D'après les résultats obtenus, pour la solution mère *Aspergillus flavus* s'étant montré légèrement plus sensible qu'*Aspergillus niger*, par contre pour les autres dilutions *Aspergillus niger* s'est avéré plus sensible. On peut dire que les deux souches présentent presque la même sensibilité vis-à-vis les extraits méthanoliques de *Thapsia garganica* L.

Les résultats obtenus peuvent être dus au :

Protocole d'extraction et au solvant utilisé qui peut altérer la richesse des extraits en substances actives.

L'évaluation du contenu en composés phénoliques dans divers organes et tissus d'un arbre peut être un indicateur très pertinent de changements d'états dus aux différentes conditions environnementales ou une réponse à des conditions de traitement particulier. Le contenu en composés phénoliques est aussi sous très forte influence génétique (**Boizot et Charpentier, 2006**).

Le séchage des racines et l'extrait a une importance majeure pour l'extraction des polyphénols car les cellules végétales contiennent différents types d'enzymes, susceptibles de provoquer des modifications des composés phénoliques contenus dans le matériel végétal, en particulier

les polyphénoloxydases et des glycosidases. Selon **Boizot et Charpentier, (2006)** l'extrait doit être soumis aux ultrasons pendant 45 minutes à 4°C pour empêcher l'action des polyphénoloxydases qui dégradent les composés phénoliques.

Selon **Valnet (1984)**, les propriétés des plantes médicinales dépendant du terrain, du climat, de l'altitude et sans doute de nombreux autres facteurs peuvent expliquer cette faible activité :

L'âge, origine, méthode de la récolte et conservation de l'échantillon.

Le diamètre de tamisage peut aussi influencer sur le taux d'extraction, et la qualité des substances extraites.

II.4. Concentration minimale inhibitrice (CMI)

Les résultats de l'évaluation des concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont résumés dans le tableau VI.

Tableau VI : Les CMI des extraits méthanoliques vis-à-vis des deux souches fongiques.

Souches fongiques	Dilution (Concentrations (mg/ml))						
	SM (50)	1/2 (25)	1/4 (12,5)	1/8 (6,25)	1/16 (3,125)	1/32 (1,562)	1/64 (0,781)
<i>Aspergillus niger</i>	±	±	±	±	+	+	+
<i>Aspergillus flavus</i>	±	±	±	±	±	+	+

+ : croissance

± : inhibition partielle

Pour l'évaluation de la CMI, plusieurs dilutions ont été préparées à partir de la solution mère allant de 1/2 jusqu'à 1/64. Les résultats enregistrés dans le tableau IV montrent qu'aux plus faibles concentrations les deux souches testées ont montré une croissance. A partir de la dilution 1/8 la croissance s'abaisse et une inhibition partielle est apparue chez *Aspergillus niger* donc la CMI est de 6,25 mg/ml, alors que pour *Aspergillus flavus* une inhibition est apparue à partir de la dilution 1/16 avec présence d'une faible croissance, cela indique que la CMI de cette dernière est de 3,125 mg/ml.

D'après les résultats des CMI obtenues on peut dire qu'*Aspergillus flavus* présente une sensibilité un peu plus élevée qu'*Aspergillus niger*.

La sensibilité de ces souches aux extraits polyphénoliques de *Thapsia garganica* L. est peut être due :

Aux teneurs en composés phénoliques trouvées dans les racines de cette plante qui peuvent être dues à la période de récolte et l'âge de la plante.

A la paroi fongique qui est constitué essentiellement de polysaccharides, exclusives de glucanes liés à la chitine. La chitine dans la paroi forme des micro-fibrilles, ce qui confère une grande résistance au milieu extérieur (**Robert et Catesson, 2000**).

D'après les résultats des CMI obtenues on remarque l'absence d'une inhibition totale pour toutes les dilutions effectuées, donc les extraits méthanoliques de *Thapsia garganica* L. ne présentent pas un effet fongicide vis-à-vis les deux souches testées. Pour cela on dit que ces extraits présentent uniquement un effet fongistatique vis-à-vis des deux souches fongiques testés. Alors qu'un effet bactéricide a été démontré par Hihat et Touati dans leur travail effectué l'année 2011 sur le dosage des composés phénoliques de *Thapsia garganica* L. et étude de leur activité antibactérienne.

Dans le présent travail nous nous sommes intéressées à l'évaluation de la teneur en composés phénoliques des racines de *Thapsia garganica* L. et la détermination de l'activité antifongique de ces substances bioactives sur deux souches fongiques *Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus*.

Au terme de ce travail, nous pouvons dire que :

Les racines de *Thapsia garganica* L. présentent une faible teneur en composés phénoliques, avec une teneur en polyphénols totaux de $1,20 \pm 0,10$ mg EAG/g MS, et de $0,043 \pm 0,032$ mg EQ/g MS pour les flavonoïdes, alors que les tannins présentent la plus faible teneur qui est de $0,0096 \pm 0,0005$ mg/ml.

L'étude de l'activité antifongique des extraits méthanoliques de *Thapsia garganica* L. a révélé que ceux-ci n'ont pas montré un grand effet sur les souches tests. Néanmoins, les deux souches fongiques ont été légèrement sensibles, avec une meilleure zone d'inhibition obtenue pour *Aspergillus flavus* ($11,66 \pm 1,52$).

Pour l'évaluation de la concentration minimale inhibitrice (CMI), les résultats ont révélé que les CMI sont $6,25$ mg/ml et $3,125$ mg/ml pour *Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus* respectivement. Pour cela on peut conclure que les extraits méthanoliques de *Thapsia garganica* L. exercent un effet inhibiteur vis-à-vis les deux souches fongiques. L'absence d'une inhibition totale indique que les extraits de *Thapsia garganica* L. présentent un effet fongistatique.

En perspective un développement de recherches effectuées sur cette plante est nécessaire, il serait intéressant dans l'avenir:

- ✓ D'élargir le nombre d'échantillons dans différentes régions.
- ✓ D'établir un protocole d'extraction plus sélectif.
- ✓ D'élargir cette étude sur d'autres aspects tels que l'activité antivirale et antibactérienne contre des souches microbiennes tout en déterminant la CMI et la CMB, et surtout de caractériser les molécules responsables de ces activités par d'autres techniques comme HPLC.

A

Adamczyk B., Kitunen V. et Smolander A.(2008). Protein precipitation by tannins in soil organic horizon and vegetation in relation to tree species. *Biol Fertil Soils*. 45:55–64.

Akroum S. (2006). Etude des propriétés biochimiques des polyphénols et tannins issus de *Rosmarinus officinalis* et *Vicia faba L.* these de magister en Biochimie et Microbiologie Appliquée. Université Mentouri de Constantine. Pp: 97.

Amory A.M. et Schubert C.L.(1987). A method to determine tannin concentration by the measurement and quantification of protein- tannin interactions. *Oecologia*. . Pp: 420-424.

Anonyme 01: http://www.wikipedia.org/Thapsia_garagnica.

Athamena S., Chalghem I., Kassah-Laouar A., Laroui S. et Khebri S. (2010). Activité anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de *cuminum cyminum L.* *Lebanese Science Journal*. 11(1) :69-81.

B

Bahorun T. (1997). Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. *Food and Agricultural Research Council, Réduit, Mauritius*, Pp: 83-94.

Bansemir A., Blume M., Schröder S. et Lindequist U. (2006). Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. *Aquaculture*, 252: 79-84.

Benet P.et Brunel J.P. (1968). Physiologie végétale. Tome II. Ed Doin. Pp: 784-788.

Berri Y. (2011). Etude des activités antinflammatoires, analgésique, toxique et antioxydante des extraits de *Thapsia garganica L.* Mémoire en vue d'obtention du Magister. Département de Biologie physico-chimique. Faculté des sciences de la nature et de la vie. Université Abderrahmane Mira. Bejaia.

Boizot N. et Charpentier J-P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'Inra*.79-82.

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.

Boullay M.M., Bussy F., Cap ., Boutron-Gharlard ., Rremy., Buignet., Gobley.,Léon S., Poggiale et Regnaud. (1870). Journal de pharmacie. Par la société de pharmacie de paris. Pp : 328-329.

Bruneton J. (2005). Plantes toxiques pour l'Homme et les animaux. 3^{ème} ed. Edition Lavoisier. Pp: 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. Pp: 65-87.

Burt S.A. et Reinders R.D. (2003). Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*. 36:162–167.

C

Cannac M., Pasqualini V., Greff S., Fernandez C. et Ferrat L . (2007). Characterization of Phenolic Compounds in *Pinus laricio* Needles and Their Responses to Prescribed Burnings. *Molecules*. 12: 1614-1622.

Cheyrier V.V., Souquet J.M., Fulcrand H., Sarni P. et Moutounet M.P. (1998). Stabilisation tanins – anthocyanes : données générales. *Unité de Recherche des Polymères et des Techniques physico-chimiques*. Pp : 10.

Chira K,Suh J-H., Saucier C et Teissedre PL-.(2008). Phytonutrition fondamentale : les polyphenols du raisin countries. *Options Méditerranéennes*. Série Séminaires 10: 15-20.

Cowan M.M. (1999). Plant Product as antimicrobial agents. *American Society for Microbiology*. 12 (4):12-14.

Crété P. (1965). Précis de botanique: systématiques des angiospermes. Edition: Masson. Pp: 301.

D

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.

Djeridane A., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P. et Vidal N. (2006). Antioxydant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phénolic compounds. *Food Chemistry*. 97: 654-660.

Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Vidal N., Lesgards JF. et Stocker P. (2007). Screening of some Algerian medicinal plants for the phénolic compounds and their antioxydant activity. *Eur Food Res Technol*. 224:801-809.

Drew D.P., Rasmussen S.K, Avato P. et Simonsen H.T. (2011). A comparison of headspace solid-phase microextraction and classic hydrodistillation for the identification of volatile constituents from *Thapsia spp.* provides insights into guaianolide biosynthesis in Apiaceae. *Phytochem Anal*. 23(1):44-51.

E

El kalamouni C. (2010). Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse : doctorat en Sciences des Agroressources. Université de Toulouse. Pp : 228.

F

Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M. et Abdelly C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus L.* organs, and their biological activities, *C. R. Biologies*. 331: 372–379.

G

Gali I. et Hammadache Z. (2011). Dosage des polyphénols des extraits éthanoliques de *Thapsia garganica L.*, ainsi que la détermination de leur activité réductrice. Mémoire de fin

de cycle, en vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en Contrôle de Qualité et Analyse. Département des Sciences Alimentaires. Université Abderrahmane MIRA de Bejaïa.

Gaussen H., Leroy J.F. et Ozenda P. (1982). Précis de botanique. Végétaux supérieurs. Tome 2. 2^{ème} ed. Edition : Masson. Pp : 386-387.

Ghedira K. (2005). Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*. 4 :162-169.

Guignard J.L. (1989). Abrégé de biochimie végétale. 2^{ème} ed. Edition : Masson

Guignard J.L. (1998). Abrégé de botanique. 11^{ème} ed. Edition: Masson. Pp: 166-169.

H

Hagerman A.E. et Butler L.G. (1978). Protein precipitation method for the quantitative determination of tannin. *Journal agriculture and Food Chemistry*. 26 (4): 809-812.

Hayette M.P., Huynen P. et Meex C. (2010). Travaux Pratiques de Microbiologie Générale. Université de Liège. Pp 62.

Hayouni E.A., Abedrabba M., Bouix M. et Hamdi M. (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*. 105 :1126-1134.

Hennebelle T., Sahpaz S. et Bailleul F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*. 1: 3-6.

Hihat Y. et Touati M. (2011). Dosage des composés phénoliques de *Thapsia garganica* L., et étude de leur activité antibactérienne. Mémoire de Master en microbiologie. Option :

Microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical et à l'environnement. Université Abderrahmane MIRA de Bejaia.

Hoffmann L. (2003). Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes, analyse de l'interaction de la caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT) avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase, l'Hydroxycinnamoyl-CoA: shikimate/quinate hydroxycinnamoyl Transférase (HCT). Pp : 332.

Hoffmann L., Besseau S., Geoffroy P., Ritzenthaler C., Meyer D., Lapierre C., Pollet P. et Legran M. (2004). Taire de hydroxycinnamoyl-Coenzyme A Hydroxycinnamoyltransferase shikimate quinate affecte la biosynthèse des phénylpropanoïdes. *La cellule végétale*. 16:1446-1465.

K

Kambou Y.S. E. (1999). Contribution à l'étude de l'activité antifongique de *Mitracarpus scaber zucc* (Rubiaceae). Thèse de doctorat. Université de Ouagadougou. Pp: 50.

Karabay-Yavasoglu N.N., Sukatar A., Ozdemir G. et Horzum Z. (2007). Antimicrobial Activity of Volatile Components and Various Extracts of the Red Alga *Jania rubens*. *Phytotherapy Research*. 21:153-156.

L

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

Lauzer M. (1868). Revue de thérapeutique médicochirurgicale Pp : 39.

Leleux A. (1857). Revue archéologique ou recueil de documents et de mémoires. Relatifs à l'étude des monuments, à la numismatique et à la philologie. Pp: 234.

Levine L. (2005). Tetrandrine and thapsigargin release arachidonic acid from cells in culture and stimulate prostacyclin production in rat liver cells, but may do so by different pathways. *BMC Pharmacology*. 5 (12): 1471-2210.

Liu H., Jensen K.G., Tran L.M., Chen M., Zai L., Olsen C.E., Sohoel H., Denmeade S.R., Isaacs J.T. et Christensen S.B. (2006). Cytotoxic phenylpropanoids and an additional thapsigargin analogue isolated from *Thapsia garganica*. *Photochemistry*. 67:2651-2658.

M

Macheix J-J., Fleuriet A. et Jay-Allemand C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux : Un exemple de métabolites secondaire d'importance économique. Ed Presses polytechnique et universitaires romandes. Pp : 185.

Mahlo S.M., McGaw L.J. et Eloff J.N. (2010). Antifungal activity of leaf extracts from South African trees against plant pathogens. *Crop Protection*. 29 (12): 1529–1533.

Manchado P.S. et Cheynier V. (2006). « Les composés phénoliques dans la plante-structure, biosynthèse, répartition et rôle ». In : Les polyphénols en agroalimentaire. Ed Lavoisier. Pp : 1-14.

Marfak A. (2003) Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides. Thèse de doctorat. Spécialité : Biophysique. Université de limoges. 228p.

Marei G.I.Kh., Abdel Rasoul M.A. et Abdelgaleil S.A.M. (2012). Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 103 : 56–61.

Martin S. et Andriantsitohaina R. (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*. 51 : 304–315.

N

Navarrete C., Sancho R., Caballero F.J., Pollastro F., Fiebich B.L., Sterner O. Appendino G. et Muñoz E.(2006). Basiliolides, a Class of Tetracyclic C19 Dilactones from *Thapsia garganica*, Release Ca²⁺ from the Endoplasmic Reticulum and Regulate the Activity of the Transcription Factors Nuclear Factor of Activated T Cells, Nuclear Factor-κB, and

Activator Protein 1 in T Lymphocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 319(1): 422-430.

Nitarajan D.J.S., Sirivasan K., Nagamurugan K., Mohanaaundari C.G. et Perumal G. (2005). Antibacterial Activity of *Euphorbia fusiformis* . A rare medicinal herb. *Journal of Ethnopharmacology*. 102: 123-126.

O

Owen P.L. et Johns T. (1999). Xanthine oxydase inhibitory activity of northeastern north American plant remedies for gout. *Journal of ethnopharmacology*. 64: 149-160.

P

Patkar S.A., Rasmussen U. et Diamant B. (1979). Histamine Release: On the Mechanism of Histamine Release Induced by Thapsigargin from *Thapsia garganica* L. *Agents and Actions*. 9(1): 53-57.

Pellau S. (2008). Quantification et caractérisation des proanthocyanidines dans *Nabrychis viciifolia* Scop. Thèse de doctorat en chimie analytique. Haute école spécialisée de Suisse occidentale. Pp : 9.

R

Raige D. Dechambre A. et Lereboullet L. (1865). Nouveau dictionnaire d'histoire naturelle appliquée aux arts. 33 : 481.

Ribéreau-Gayon P. (1968). Les composés phénoliques des végétaux. *Editions Dunod, Paris*, 254p.

Robert D. et Catesson A.N. (2000). «Construction d'organismes complexes à structure filamenteuse ». In : Organisation végétative. Ed DOIN. Tom 2. Pp:104.

Rodriguez-Tudela J.K., Chryssanthou E., petrikkou E., Mosquera J., denning D.W et Cuenca-Estrella M. (2003). Interlaboratory Evaluation of Hemacytometer Method of Inoculum Preparation for Testing Antifungal Susceptibilities of Filamentous Fungi. *J Clin Microbiol*. 41(11): 5236–5237.

Rogers T.B., Inesi G., Wade R., et Lederel W. J. (1995). Use of Thapsigargin to Study Ca²⁺ Homeostasis in Cardiac Cells. *Bioscience Reports*. 15(5):341-349.

Roques J. (1835). *Phytographie médicale, histoire des substances héroïques et des poisons.* Pp: 411.

Ryan D., Antolovich M., Prenzler P., Robards k et lavec S. (2002). Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea L.* *Scientia Horticulturae*. 92:147-176.

S

Scalbert A. et Williamson G. (2000). Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. American Society for Nutritional Sciences. Pp: 2073-2085.

Scheepens A., Tan K. et Paxton J.W. (2010). Improving the oral bioavailability of beneficial polyphenols through designed synergies. *Genes Nutr*. 5:75–87.

Škerget M., Kotnik P., Hadolin M., Hraš A.R., Simonič M. et Knez Ž. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*. 89: 191-198.

Sulaiman S.F., Abu Bakar Sajak A., Ooi K.L., Seow E.M. et Supriatno.(2011). Effect of solvents in extracting polyphenols and antioxidants of selected raw vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*. 24(5): 506–515.

T

Turkmen N., Sari F. et Velioglu Y.S. (2006). Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. *Food Chemistry*. 99 : 835-841.

Turkmen N., Velioglu Y.S., Sari F. et Polat G. (2007). Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea. *Molecules*. 12: 484-496.

V

Valnet J. (1984). Aromathérapie, traitement des maladies par les essences des plantes. Edition : Maloine S.A. Pp: 192-196.

Vatai T., Škerget M. et Knez Ž. (2009). Extraction of phenolic compounds from elder berry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering*.90: 246-254.

Vermerris W. et Nicholson R. (2006). « Isolation and identification of phenolic compounds» In Phenolic compound biochemistry. Ed. *Springer*. USA, Pp: 267.

Y

Young Cho J., Ja Choi G., Wan Son S., Soo Jang K., Lim H.K., Og Lee S., Do Sung N., Yan-Cho K. et Kim J-C. (2007). Isolation and antifungal activity of lignans from *Myristica fragrans* against various plant pathogenic fungi. *Pest Management Science*. 63:935–940.

Z

Zeghad N. (2009). Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magister (Ecole doctorale) Option : Biotechnologie végétale. Université Mentouri Constantine. Faculté des sciences de la nature et de la vie. Département de biologie végétale et écologie. Pp : 96.

Zimmer N. et Cordesse R. (1996). Influence des tannins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. *INRA productions animales*. 9(3): 167-179.

Annexe I : matériels et produits chimiques

1- Le matériel du laboratoire

- **La verrerie** : tubes à essai, béchers, pipettes, erlenmayer, flacons,
- **L'appareillage**
 - Bain marie (Bensen)
 - Balance de précision (adventuer OHAUS)
 - Bec benzène
 - Broyeur (A11 basic IKA-Works)
 - Centrifugeuse
 - Etuve (MEMMERT)
 - Microscope optique
 - pH-mètre
 - Plaque magnétique (Raypa Trade)
 - Spectrophotomètre UV-visible (Mode P4111RS)
 - Tamiseur
 - Vortex (Vortex 2-Genie)
- **Autres** : spatule, micropipettes (du 100µl et 1000µl), tubes à hémolyse, papier aluminium, papier absorbant, papier filtre, Cellule de MALASSEZ, parafilm, once de platine, pince, boîtes de Petri.

2- Les produits chimiques et solvants

- Réactif de Folin-Ciocalteu (FCR).
- Carbonate de sodium (Na_2CO_3)
- Trichlorure d'aluminium (AlCl_3)
- Sulfate ferreux ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- Acide chlorhydrique (HCl)
- n-butanol
- Eau distillée
- Eau physiologique stérile
- Tween20
- Ethanol: $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$, 96%, MM=46,07g/mol (Biochem Chemophorma)
- Methanol : CH_3OH , 79%, MM=32,04 g/mol (PROLABO)

- **Les standards utilisés**

- Acide gallique
- Quercétine

3- Milieux de culture utilisés

- **Potato Dextrose Agar (PDA)**

- Extrait de pomme de terre (à partir de 200g) 1l
- Glucose 20g
- Gélose 15g
- pH 5,6

- **Muller-Hinton (MH)**

- Extrait de viande 20g
- Hydrolysate acide de caséine 17,5g
- Amidon 1,5g
- Gélose 10g
- pH 7,6

Annexe II : préparation des solutions

1- Solution d'acide gallique (1mg/ml)

10mg de poudre d'acide gallique dissoutes dans 10ml de l'eau distillée.

2- Solution de Folin-Ciocalteu dilué à 1/10

1ml de réactif de Folin- Ciocalteu ajouté à 9ml de l'eau distillé.

3- Solution de Carbonate de sodium à 7.5%

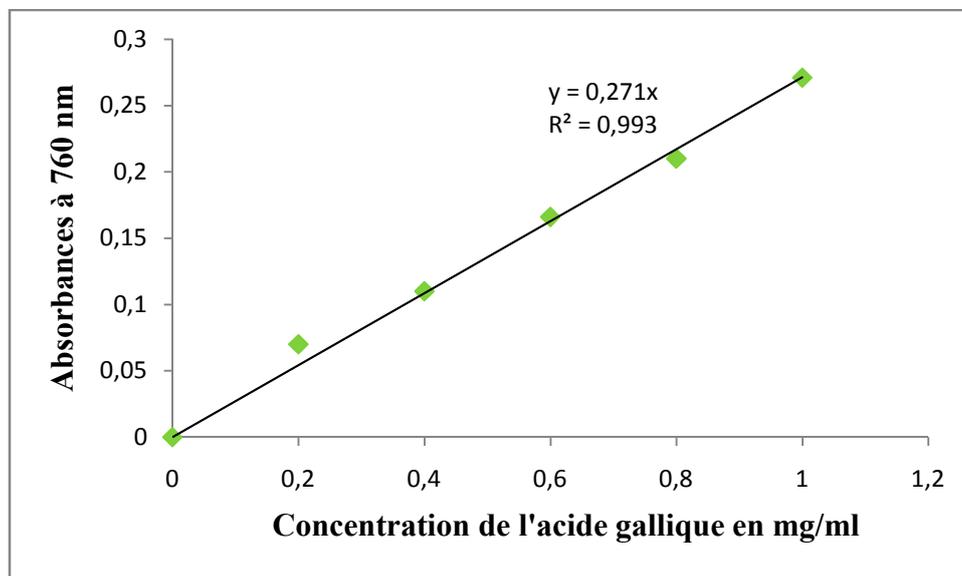
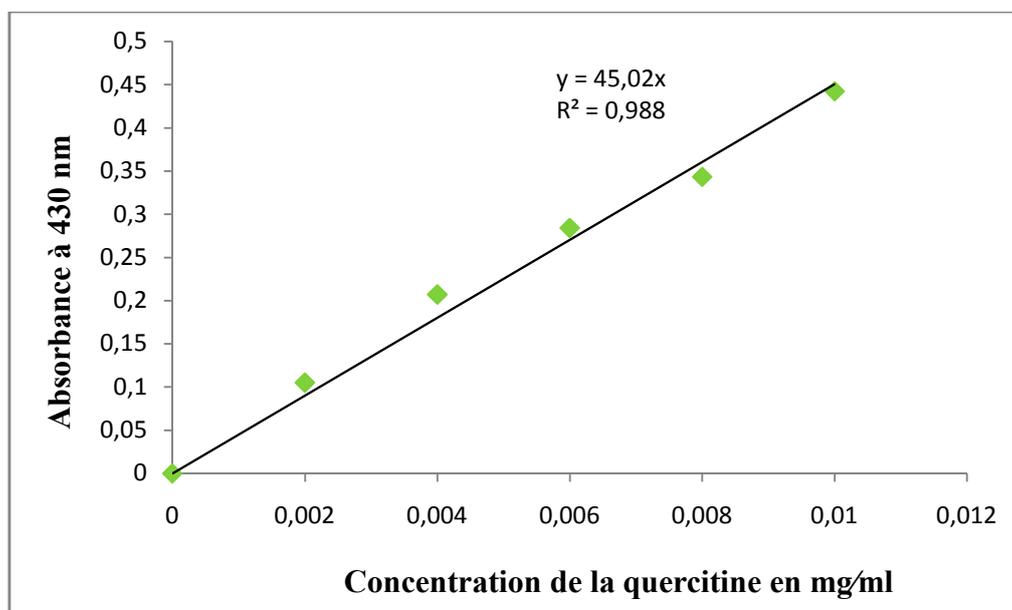
7.5g de poudre de Na_2CO_3 dans 100 ml d'eau distillée.

4- Solution de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) à 2%

2g de poudre de trichlorure d'aluminium diluée dans 100ml d'eau distillé.

5- Solution d'acide sulfate ferreux

- 77mg de $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 500ml (200ml HCl + 300ml n-butanol)

Annexe III : Courbes d'étalonnage**Dosage des polyphénols totaux****Dosage des flavonoïdes**

Glossaire botanique

Angiospermes : sous embranchement des phanérogames dont l'ovule est contenu dans un ovaire clos.

Bisannuelle : plante bisannuelle, accomplit son cycle de vie en deux années.

Cyme : mode d'inflorescence constitué par un axe principal à l'extrémité duquel se trouve une fleur, et qui porte également un ou plusieurs axes latéraux se ramifiant de la même manière.

Fistuleuse : qui est de la nature de la fistule (canal qui se forme dans l'organisme et donne passage à une sécrétion naturelle).

Hermaphrodite : être vivant qui possède les organes reproductifs de deux sexes.

Ombelle : mode d'inflorescence dans lequel les pédoncules floraux partent tous d'un même point et arrivent à peu près au même niveau.

Pétiole : partie rétrécie de la feuille, qui lui sert de support.

Résine : substance qui découle de certains végétaux.

Spermaphyte : plante qui se reproduit par des graines.

Vivace : plante vivace, dont les racines vivent plus de deux ans et dont la tige se renouvelle chaque année.

Glossaire médicale

Antimitotique : substance qui s'oppose au processus de la mitose.

Apoptose: ou (mort cellulaire programmée) processus par lequel des cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un signal. C'est l'une des voies possibles de la mort cellulaire, qui est physiologique, génétiquement programmée, nécessaire à la survie des organismes multicellulaires.

Cataplasme : compresse humide ou bouillie épaisse que l'on applique sur une partie du corps comme agent thérapeutique.

Cloque : petite poche se formant sous l'épiderme remplie de sérosité.

Emétique : qui fait vomir.

Diurétique : qui augmente la sécrétion de l'urine.

Histamine : médiateur chimique de l'hypersensibilité immédiate, qui joue un rôle essentiel dans les processus de la réaction allergique.

Pleurésie : inflammation de la plèvre (membrane séreuse qui entoure le thorax et les poumons).

Prurit : vive démangeaison.

Purgatif : qui a la propriété de purger, d'évacuer le contenu de l'intestin.

Rubéfiant : substance dont l'application sur la peau produit une rougeur intense et passagère.

Ulcérogène : se dit de ce qui provoque un ulcère, perte de substance de la peau ou d'une muqueuse cicatrisant difficilement.

Résumé

Thapsia garganica L. fait partie de la famille des Apiacées, largement répandue dans le bassin méditerranéen. Ses multiples propriétés biologiques sont dues à sa richesse en substances bioactives. L'étude de l'activité antifongique des extraits de plantes notamment les polyphénols est utilisée à la manière des antibiotiques. L'intérêt du présent travail est porté d'une part, sur le dosage des composés phénoliques des racines de *Thapsia garganica* L. dont les polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins condensés en utilisant comme solvant d'extraction l'éthanol aqueux à 96%. Le résultat de dosage pour les polyphénols totaux est de $1,20 \pm 0,10$ mg EAG/g MS alors que pour les flavonoïdes il est de $0,043 \pm 0,032$ mg EQ/g MS ainsi que pour les tannins condensés qui présentent une teneur très faible qui est de $0,0096 \pm 0,0005$ mg/ml. Et d'autre part la détermination de l'activité antifongique de ces extraits vis-à-vis de deux souches fongiques appartenant au même genre *Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus*, par la méthode de diffusion sur disque. Il a été noté qu'*Aspergillus flavus* est plus sensible qu'*Aspergillus niger* avec des CMI de 3,125 mg/ml et 6,25 mg/ml respectivement. Un effet fongistatique est enregistré vue l'absence de l'inhibition totale de la croissance.

Mots clés : *Thapsia garganica* L., Apiacées , composés phénoliques, activité antifongique.

Abstract

Thapsia garganica L belongs to the family of Apiaceae, largely widespread in the Mediterranean basin. Its multiple biological properties are due to its wealth of bioactives substances. The study of the antifungal activity of the extracts of plants in particular the polyphenols is used with the manner of antibiotics. The interest of this work is carried on the one hand: on the evaluation of polyphenols content of the roots of *Thapsia garganica* L. of which total polyphenols, flavonoïdes and condensed tannins by using like solvent of extraction aqueous ethanol with 96%. The result for total polyphenols is $1,20 \pm 0,10$ mg EAG/g of dried material whereas for the flavonoïdes it is of $0,043 \pm 0,032$ mg EQ/g of dried material as for condensed tannins which present a very low content which is of $0,0096 \pm 0,0005$ mg/ml. And in addition: determination of the antifungal activity of these extracts on two fungic stocks belonging to the same kind *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus*, by the method of diffusion on disc. It was noted that *Aspergillus flavus* is more sensitive than *Aspergillus niger* with MIC of 3,125 mg/ml and 6,25 mg/ml respectively. An effect fongistatic is recorded seen the absence of total inhibition of the growth.

Key words: *Thapsia garganica* L., Apiaceae, polyphenols, antifungal activity.