

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLAB –BLIDA-

FACULTE DES SCIENCES AGRO-VETERINNAIRES

DEPARTEMENT DES SCIENCES AGRONOMIQUES

Étude de l'activité antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles et
des extraits phénoliques de « *Thapsia garganica L* » des deux régions

(Blida et Bejaia)

Projet de fin d'études en vue de l'obtention
Du diplôme d'ingénieur d'État en agronomie

Spécialité : sciences alimentaires

AINSER Radia

MOUSSAOUI Asma

Devant le jury composé de :

M ^r . BOUSBIA.N.	Maitre-assistant B	USDB	Président du jury
M ^{me} KADRI.B.	Maitre de conférences B	USDB	Promoteur.
M ^{me} AIT YAHIA.K.	Maitre assistante A	USDB	Co-promotrice.
M ^r . HARFOUF	Maitre de conférences B	USDB	Examineur
M ^{me} . OUTALEB.T.	Maitre assistante A	USDB	Examinatrice.
M ^{me} FERNANE.	Maitre assistante B	USDB	Examinatrice.

ANNEE UNIVERSITAIRE 2012/2013

Dédicace

Je dédie ce travail à :

Mes chers parents, lumière de ma vie ;

A ma sœur et amie, mon binôme Asma ;

A mon cher frère Samir ;

A mes chers sœurs : Rahima, Soraya,
Souhila, Sara ;

A mes beaux frères : Mourad et Boualem ;

Aux petits : Inass, Oussama, Amine et
Basma ;

A mon fialencé Waali ;

A mes cousines ; Khalissa, Hamida, Souad,
Karima et Naima ;

A mes amies : Sara, Houda, Lamia, Selma ;

A tous ceux qui me connaissent

Radia

Dédicace

A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :

A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma mère qui ma apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité.

A mon cher père qui ma appris le sens de la persévérance tout au long de mes études, pour son sacrifice ses conseils et ses encouragements.

A ma très chère sœur SANA

A mon très chère frère : SID ALI

A toute la famille MOUSSAOUI et SAADI

A mes amis

ASMA

Résumé

Ce travail a porté sur l'extraction des huiles essentielles par une hydrodistillation de (type Clevenger) et des composés phénoliques par soxhlet des feuilles et des racines de « *Thapsia garganica L* » provenant des deux régions (Blida et Bejaia), tout en comparant leurs rendements, leurs activités antioxydantes ainsi que leurs activités antimicrobiennes.

Les propriétés antioxydantes ont été évaluées par trois tests : le test de piégeage du radical (DPPH), le test de blanchissement du β -carotène et le test de la réduction de fer (FRAP). L'activité antimicrobienne est évaluée par la méthode d'aromatogrammes sur sept germes.

Les résultats des trois tests antioxydant ont montrés que les huiles essentielles et les extraits phénoliques de la plante de Bejaia ont un pouvoir antioxydant plus important que ceux de la plante de Blida, par ailleurs. Le test d'aromatogramme a révélé que l'huile essentielle de la plante *Thapsia garganica* est un agent antimicrobien.

Mots clés : *Thapsia garganica*, huile essentielle, extrait phénolique, hydrodistillation, antioxydant.

ملخص

يتضمن هذا العمل استخلاص الزيوت الأساسية بطريقة التقطير المائي بواسطة جهاز كليفنجر و المواد الفينولية بواسطة السوكسلي من أوراق وجذور نبتة بونافع المقتطفة من منطقتي البلدية بجاية, وذلك بهدف مقارنة مردودية النبتتين من الزيوت الأساسية والمواد الفينولية ومقارنة نشاطهما ضد الاكسدة وضد المكروبات.

الخصائص المضادة للأكسدة قد قيمت عن طريق ثلاثة طرق وهي: التفخيخ الجذري DPPH ، تبييض β carotene و إرجاع Fe^{3+} (FRAP). إن نشاط مضادات المكروبات قد تم تقييمه عن طريق الاروماتوغرام على سبعة جراثيم. إن النتائج الخاصة بالتجارب الثلاثة المضادة للأكسدة قد بينت إن الزيوت الأساسية والمستخلصات الفينولية لنبتة بجاية لديها قدرة مضادة للأكسدة اكبر من تلك المتحصل عليها من نبتة البلدية بينما التجارب الاروماتوغرام بينت إن الزيوت الأساسية المستخلصة من نبتة بونا فع هي بمثابة عامل مضاد للجراثيم.

المصطلحات نبتة بونافع، الزيوت الاساسية، المواد الفينولية، ضد الاكسدة

Abstract

This work

Liste des abréviations

- $O_2^{\cdot -}$: Anion superoxyde
- O_2 : Oxygène moléculaire
- OH^{\cdot} : le radical hydroxyle
- H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène
- RO_2^{\cdot} : Radical peroxyde
- NO^{\cdot} : Oxyde nitrique
- $ONOO^-$: Peroxynitrite
- 1O_2 : Oxygène singulet
- R^{\cdot} : Radical libre carboné
- **ROOH** : Hydroperoxydes organique
- **AGPI** : Acide gras polyinsatu
- **ADN** : Acide désoxyribonucléiques
- **SOD** : Superoxyde dismutase
- **EOA** : Espèce oxygéné activé
- **RLO** : Radical libre oxygéné
- **GSHPX** : Glutathion peroxydase et réductase
- **GPx** : Glutathion peroxydase
- **GSH** : Glutathion
- **GR** : Glutathion réduit
- **GSSH** : Glutathion oxydé
- **LDL** : Lipoprotéine de petite densité
- **HHDP**: Hexahydroxydiphéniques
- **BHA** : Butylhydroxyanisol
- **BHT**: Butylhydroxytoluène
- **AFNOR** : Association française de normalisation
- **TEAC** : Trolox equivalent antioxidant capacity
- **ORAC** : Oxygen radical absorbance capacity
- **DPPH** : Radical 2 ,2 Diphenyle-1- picrylhydrazyl
- **FRAP** : Ferric reducing antioxidant power
- **nm** : Nanomètre
- **mL** : Millilitre
- **mg** : Milligramme
- **g** : Gramme
- **%** : Pourcentage

LISTE DES TABLEAUX

Tableau n°1 : Les espèces réactives de l'O ₂	4
Tableau n°2 : Les produits chimiques utilisés pour la réalisation de travail	34
Tableau n°3 : différentes concentrations des huiles essentielles et des extraits phénoliques utilisées lors du test DPPH.....	46
Tableau n°4 : illustre les caractéristiques, et les principales pathologies des souches microbiennes testées.....	51
Tableau n°5 : Rendement en huile essentielle de l'espèce étudiée (g/100g de matière végétale).....	55
Tableau n°6 : Comparaison des différents rendements en huile essentielle de l'espèce étudiée des régions différentes.....	56
Tableau n°7 : Les caractéristiques physiques et organoleptique des huiles essentielles de « <i>Thapsia garganica L</i> » des deux régions.....	57
Tableau n°8 : La teneur en phénols totaux de l'extrait de « <i>Thapsia garganica</i> » provenant des deux régions étudiées.....	58
Tableau n°9 : la capacité antiradicalaire des l'huiles essentielles de <i>Thapsia garganica L</i>	59
Tableau n°10 : la capacité antiradicalaire des extraits phénoliques de <i>Thapsia garganica L</i> des deux régions.....	62
Tableau n°11 : variation des diamètres des zones d'inhibitions de la croissance des bactéries par les huiles essentielles des feuilles et des racines de <i>Thapsia garganica L</i> des deux régions.....	71
Tableau n°12 : variation des diamètres des zones d'inhibitions de la croissance des levures et des champignons par les huiles essentielles des feuilles et des racines de <i>Thapsia garganica L</i> des deux régions Blida et Bejaia.....	73

LISTES DES FIGURES

Figure1 : les principales espèces réactives de l'oxygène sont formées au cours de la réduction de l'oxygène en eau au niveau de la mitochondrie	3
Figure2 : Production mitochondriale et prise en charge de l'anion superoxyde	5
Figure3 : origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène en biologie	7
Figure 4 : Définition du stress oxydant.....	8
Figure 5 : Phases d'initiation, de propagation et de terminaison de la peroxydation lipidique. R [•] : radical initiateur (ERO) ; LH : acide gras polyinsaturé ; L [•] : radical lipidique ; LOO [•] : radical peroxyde ; LOOH : hydroperoxyde ; LO [•] : radical alkoxyde ; [•] OH : radical hydroxyle ; O ₂ : oxygène ; LOOL : produit stable	9
Figure 6 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules	10
Figure7 : Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques.....	14
Figure8 : Structure de la vitamine E.....	15
Figure9 : Structure de la vitamine C.....	16
Figure10 : structure de β-carotène	16
Figure 11 : principaux acides phénoliques	18
Figure 12 : Structure de base des flavonoïdes.....	19

Figure13 : Structure des majeures classes des flavonoïdes.....	19
Figure14 : Exemple de structure d'un tanin condensé et hydrolysable.....	20
Figure 15 : Schéma explicatif de l'effet protectif des polyphénols contre les radicaux libres.....	21
Figure 16 : Effets biologiques des polyphénols. eNOS, NO synthase endothéliale ; NO synthase inductible ; NF-κB, facteur nucléaire –κB.....	22
Figure 17 : Exemple des composants monoterpènes.....	26
Figure 18 : Exemple des composants sesquiterpéniques.....	27
Figure 19 : La vanilline.....	27
Figure 20 : Coupe schématique d'un alambic pour l'hydrodistillation Chauffage indirect (injection de vapeur surchauffée).....	29
Figure21 : Coupe schématique d'un alambic pour la vapo-hydrodistillation. Le chauffage est assuré par injection de vapeur surchauffée produite séparément	30
Figure 22 . Schéma d'un appareil de distillation des plantes aromatiques à générateur de vapeur séparé de l'alambic (vapodistillation).....	31
Figure25 : Carte géographique de la wilaya de Blida en (a) et carte géographique de la région de Somaa en (b)	38
Figure 26 : carte géographique de la région de Bejaia en (a) et carte géographique de la région d'Adekar en (b)	38
Figure 27 : Montage d'hydrodistillation (dispositif Clevenger).....	39
Figure28 : Forme libre et réduite du radical DPPH.....	44
Figure 29 : Illustration de la méthode d'Aromatogramme sur boite Pétri	49
Figure30 : Histogramme des rendements des huiles essentielles de « <i>Thapsia garganica L</i> » de Blida et de Bejaia.....	58

Figure29 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.	57
Figure 30 : Histogramme des teneurs en phénols totaux des extraits de <i>Thapsia garganica</i> des deux régions étudiées.....	58
Figure 31 : Histogramme la capacité antiradicalaire des l'huiles essentielles de <i>Thapsia garganica L</i> des deux régions.....	60
Figure32 : Histogramme de la capacité antiradicalaire des extraits phénoliques de <i>Thapsia garganica L</i> des deux régions.....	62
Figure33 : Cinétique de blanchissement du β -carotène à 490 nm en absence et en présence des antioxydants (huiles essentielles et BHT).....	64
Figure34 : Histogramme de l'activité antioxydante relative des huiles essentielles des deux plantes.....	65
Figure35 : Cinétique de blanchissement du β -carotène à 490 nm en absence et en présence des antioxydants (extraits phénoliques et BHT).....	66
Figure36 : Histogramme de l'activité antioxydante relative des composés phénoliques des deux plantes.....	67
Figure37 : Histogrammes représentant le pouvoir réducteur des huiles essentielles, BHA, BHT et de l'acide ascorbique.....	68
Figure38 : Histogrammes représentant le pouvoir réducteur des extraits phénoliques, BHA, BHT et de l'acide ascorbique.....	69
Figure 39 : Photos montrant l'effet des huiles essentielles de <i>thapsia garganica L</i> des deux régions sur <i>Ecoli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Ps aeuroginosa</i>	70
Figure 42 : histogramme de la variation des diamètres des zones d'inhibitions de la croissance des bactéries par les huiles essentielles des feuilles et des racines de <i>Thapsia garganica L</i> des deux régions.....	71
Figure43 : photos montrant l'effet des huiles essentielles de <i>Thapsia garganica L</i> des deux régions sur <i>candida albican</i> ; <i>candida tropi</i> et <i>aspergillus niger</i>	72

Figure44 : histogramme de la variation des diamètres des zones d'inhibitions de la croissance des levures et champignons par les huiles essentielles des feuilles et des racines de *Thapsia garganica* L des deux régions.....73

TABLE DES MATIERES

Introduction.....	1
PARTIE BIBLIOGRAPHIE	
CHAPITRE I : Radicaux libres et stress oxydant	
I.1. Définition.....	3
I. 2. Espèces réactives de l'O ₂	3
I.2.1. Anion superoxyde	4
I.2.2. Peroxyde d'hydrogène.....	5
I.2.3. Le radical hydroxyle.....	6
I.2.4. Le radical peroxyde.....	6
I.3. stress oxydant.....	7
I.3.1. Définition.....	7
I.3.2. Conséquences du stress oxydant	8
• La peroxydation lipidique	8
• Oxydation des protéines	9
• Oxydation de l'ADN	10
I.3.3. Pathologie liées au stress oxydant	10
• Le vieillissement	11
• le cancer	11
CHAPITRE II : Les antioxydants	
II.1. Définition.....	12
II. 2-classification des antioxydants	12
II.2-1-les antioxydants naturels	12
II.2-1-1-les antioxydants primaires	12
a. les superoxydes dismutases.....	12
b. les catalases	13
c. Les glutathions peroxydases et réductases	13
II.2-1-2-les antioxydants secondaires	15
a. Les Vitamines	15

• La vitamine E	15
• La vitamine C	16
• Les caroténoïdes	16
b. les oligoéléments	16
c. les composés phénoliques.....	17
▪ Classification.....	17
1. Formes simples	17
1. 1. Les acides phénoliques	17
1. 1.1. Acides hydroxybenzoïques	18
1. 1.2. Acides hydroxycinnamiques	18
1. 2. Les hydrocoumarines	18
1. 3. Les stilbènes	18
1. 4. les flavonoïdes	19
2. Formes condensées	20
2. 1. les tanins	20
2. 1.1. les tanins condensés	20
2. 1.2. les tanins hydrolysables	20
2. 2. La lignine.....	21
▪ Rôle des polyphénols comme antioxydant	21
▪ l'activité biologique des polyphénols.....	22
II. 2.1.3. les antioxydants tertiaires	23
II. 2. 2. Les antioxydants synthétiques	23
I.3. Les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante	23
1- Evaluation de produits résultant de l'oxydation	24
2- Evaluation de l'aptitude du composé a piégé des radicaux libres.....	24
CHAPITRE III : Les huiles essentielles	
III.1. Définition.....	25
III.2. Propriétés physiques	25
III.3. Composition chimiques	26
III.3.1. Terpénoïdes	26

III. 3.1.1. les monoterpènes.....	26
III.3.1.2. les sesquiterpènes	27
III.3.2. Composés aromatiques	27
III.3.3. Composés d'origine divers	27
III.4. Localisation des huiles essentielles	28
III.5. Rôle dans la plante	28
III.6. Propriétés antimicrobiennes	28
III.7. Les méthodes d'extractions	29
III.7.1. La Distillation	29
III.7.1.1. Distillation par l'eau ou « hydrodistillation ».....	29
III. 7.1.2. Entraînement à la vapeur d'eau ou « Vapo-hydrodistillation ».....	30
III.7.1.3. Distillation à la vapeur directe génération séparé ou « vapo distillation »	31
.....	31
III.7.2. Expression à froid.....	32

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE IV : Matériel et méthodes

IV. 1. Objectif du travail.....	33
IV. 2. Lieux d'expérimentation	33
IV. 3. Matériel chimique	33
IV. 4. Matériel végétal	34
IV. 4.1. Appellation et Noms vernaculaires	34
IV. 4.2. Description.....	36
IV. 4.3. Classification	38
IV. 4.4. Cueillette de la plante	38
IV. 4.5. Séchage, broyage et tamisage	40
IV. 5. Extraction d'huile essentielle de « Thapsia garganica L ».....	41
IV. 5.1. Rendement de l'huile essentielle	41
I.6. Extraction des composés phénoliques (Extraction par soxhlet)	42
IV. 6. Dosage des phénols totaux	42

IV. 6. 1. Principe	42
IV. 6 .2 . Mode opératoire	43
IV. 6.2.1. Courbe d'étalonnage	43
IV. 7. Etude de pouvoir antioxydant	44
IV. 7.1. Activité de piégeage du radical DPPH	45
IV. 7.1.1. Principe	45
IV. 7.1.2. Expression des résultats	47
IV. 7.2. Test de blanchissement du β - carotène	47
IV. 7.2.1. Principe	47
IV. 7.3. Test de la réduction du fer (FRAP)	48
IV. 7.3.1. Principe	48
IV. 7.3.2. Mode opératoire	48
IV. 8. Evaluation de l'activité antimicrobienne	50
IV. 8.1. Aromatogramme	50
IV. 8.1.1. Principe	50
IV. 8.1.2. Souches microbiennes choisies	53
IV. 8.1.3. protocole expérimentale	53
IV. 8.2. La concentration minimale inhibitrice(CMI)	54

CHAPITRE V : Résultats et discussion:

V. 1. Extraction des huiles essentielles de « <i>Thapsia garganica L</i> » récoltée de deux régions différentes (Blida et Bejaia)	55
V. 2. Caractéristiques physiques et organoleptique des huiles essentielles de « <i>Thapsia garganica L</i> » des deux régions étudiées.....	57
V. 3. Dosage des phénols totaux	57
V. 4. Etude de pouvoir antioxydant des huiles essentielles et des extraits phénolique	59
V. 4.1. Activité de piégeage du radical DPPH	59
• Activité de piégeage du radical DPPH des huiles essentielles.....	59
• Activité de piégeage du radical DPPH des extraits phénoliques	61
V. 4.2. Test de blanchissement du β -carotène.....	64
• Activité antioxydante des huiles essentielles	64

V. 4.3. Test de réduction de fer (FRAP).....	68
V. 5. Etude de l'activité antimicrobienne	70
V. 5.1. Aromatogramme	70
• Activité antibactérienne.....	71
• Activité antifongiques.....	73
V. 5.2. Concentration minimale inhibitrice (CMI)	75
Conclusion	

L'oxygène moléculaire est un élément crucial pour la vie des organismes aérobiques, toutefois il peut former des espèces partiellement réduites et fortement toxiques appelées les radicaux libres ou encore les espèces oxygénées réactives (EOR). Aux doses faibles, les EOR sont très utiles pour l'organisme et jouent des rôles importants dans divers mécanismes physiologiques tel que la transduction du signal. Aux doses excessives, les EOR deviennent néfastes et toxiques pour l'organisme. La surproduction des EOR au delà des capacités antioxydantes des systèmes biologiques donne lieu au stress oxydant qui est impliqué dans l'apparition de plusieurs maladies allant de l'artériosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, les ischémies et le processus du vieillissement

Pour échapper aux conséquences du stress oxydant, il est nécessaire de rétablir l'équilibre oxydant / antioxydant afin de préserver les performances physiologiques de l'organisme. Les antioxydants font actuellement l'objet de nombreuses études car, en plus d'un intérêt certain dans la conservation des denrées comestibles, ils pourraient s'avérer utiles dans la prophylaxie et le traitement des maladies dans lesquels le stress oxydant est incriminé.

Les risques et les effets néfastes des antioxydants synthétiques utilisés comme additifs alimentaires ont fait l'objet de questions au cours des dernière années et la nécessité de les substituer par des antioxydants naturels, issus de plantes médicinales, est apparente. Les plantes médicinales constituent une source inépuisable de substances ayant des activités biologiques et pharmacologiques très variées.

C' est pourquoi nous nous sommes intéressé de faire une étude comparative de l'activité antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits phénoliques de la plante *Thapsia garganica* L. poussant à l'état spontané dans les régions de Blida et Bejaia.

Thapsia garganica occupe une place privilégiée dans le traitement de certaines pathologies, celle-ci 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.

Le genre «*Thapsia* » comprend environ quarante et un espèces, originaires d'Afrique, d'Asie et d'Europe. *Thapsia garganica* est une espèce répandue en

Algérie, connue surtout pour l'utilisation de ses racines en cuisine et en médecine traditionnelle.

Notre travail a été divisé en deux parties ; nous aborderons dans une première partie une étude bibliographique qui regroupe trois chapitres dont le premier concerne les radicaux libres et stress oxydant. Le deuxième chapitre est consacré aux antioxydants et quelques méthodes d'évaluation de leur pouvoir. Nous donnerons dans le troisième chapitre une description des huiles essentielles.

La deuxième partie, abordera un chapitre présente le matériel et les méthodes utilisées dans ce travail qui porte sur :

- Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation de type Clevenger et des extraits phénoliques des feuilles et des racines de *Thapsia garganica* L provenant des deux régions (Blida et Bejaia).

- Dosage des phénols totaux des extraits phénoliques.

- Une étude de l'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits phénoliques des plantes prévenants des deux régions, par trois méthodes,

Le piégeage du radical libre DPPH, Blanchiment du β carotene et réduction de fer.

- une étude de l'activité antimicrobienne par deux méthodes aromatoigramme et CMI (concentration minimale d'inhibition) des huiles essentielles et des extraits phénoliques des deux plantes.

Le dernier chapitre résume les résultats ainsi que leurs discussions.

I.1. Définition :

Un radical libre est défini comme une molécule ou un atome ne contenant qu'un seul électron (électron célibataire) sur son orbitale externe (couche de valence). Cet électron célibataire offre une très grande réactivité chimique au « radical libre ». Ces radicaux libres sont produits dans tous les tissus et cellules de l'organisme. Leur existence est généralement, de courte durée (de quelques nano secondes et quelques secondes, selon la molécule) (**Jacques R et al., 2003**).

I. 2. Espèces réactives de l'O₂ :

La formation des principales espèces réactives de l'oxygène peut être apportée par la chaîne de réduction monovalente de l'oxygène. Elle consiste en l'addition successive sur la molécule d'oxygène, un par un de quatre électrons conduisant à la formation de la molécule d'eau (**Dellatre et al., 2003**).

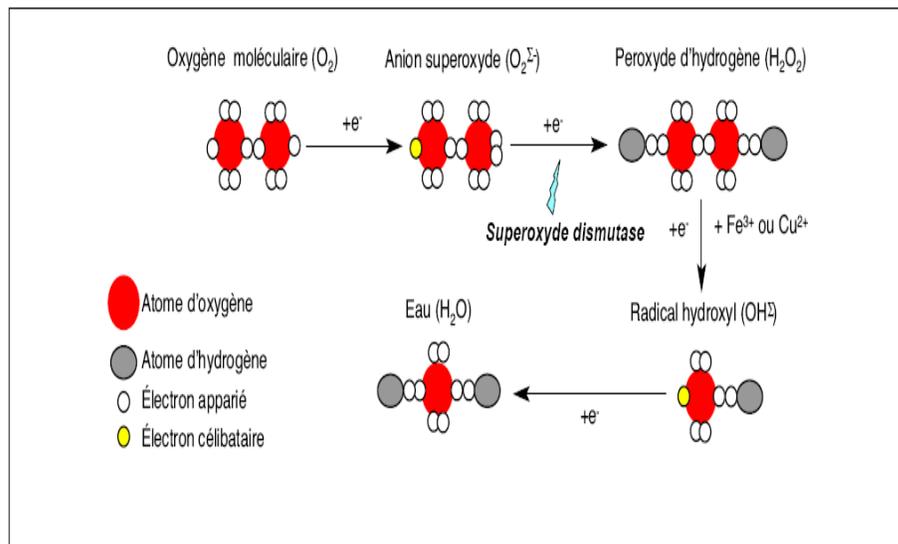


Figure1 : les principales espèces réactives de l'oxygène sont formées au cours de la réduction de l'oxygène en eau au niveau de la mitochondrie (**Leborgne et al ., 2002**).

Le tableau ci-dessous représente les principales espèces réactives de l'oxygène

Tableau 1 : Les espèces réactives de l'O₂ (Alain et al., 2007)

Nom	Symbole chimique
Les radicaux libres de l'O ₂	
Anion superoxyde	O ₂ ^{•-}
Le radical hydroxyle	OH [•]
Le radicale peroxyde	RO ₂ [•]
Oxyde nitrique	NO [•]
peroxynitrite	ONOO ⁻
Les espèces activées de l'O ₂	
Oxygène singulet	¹ O ₂
peroxyde	H ₂ O ₂

I.2.1. Anion superoxyde :

Les radicaux superoxydes O₂^{•-} Sont des radicaux relativement peu réactifs par eux – mêmes, mais dont la toxicité provient du fait qu'ils peuvent donner naissance à des composés plus réactifs (Delattre et al., 2003). Il ya 3 origines principales :

Au niveau de la chaine respiratoire mitochondriale : la mitochondrie est le siège majoritaire de la synthèse des radicaux superoxydes (Lacolley, 2007), environ 2% de l'O₂ est transformé en radicaux superoxyde (Bonfont, 2007).

Par des enzymes oxydases : de nombreux enzymes peuvent réduire O₂ en O₂^{•-} en particulier la NAD(P)H oxydase (Moussard, 2006).

La NADPH oxydase est une enzyme cellulaire initialement connue dans les cellules phagocytaires, à l'origine également de la production extracellulaire d'anion superoxyde (Milane, 2004).

Par des molécules qui peuvent être substrats de réaction d'auto oxydation (non enzymatique), comme le glucose, les monoamines (dopamine, noradrénaline, adrénaline) ..., conduisant également à la formation d' $O_2^{\cdot -}$ (Moussard, 2006).

La production mitochondriale en anion superoxyde est représentée dans la figure n°2

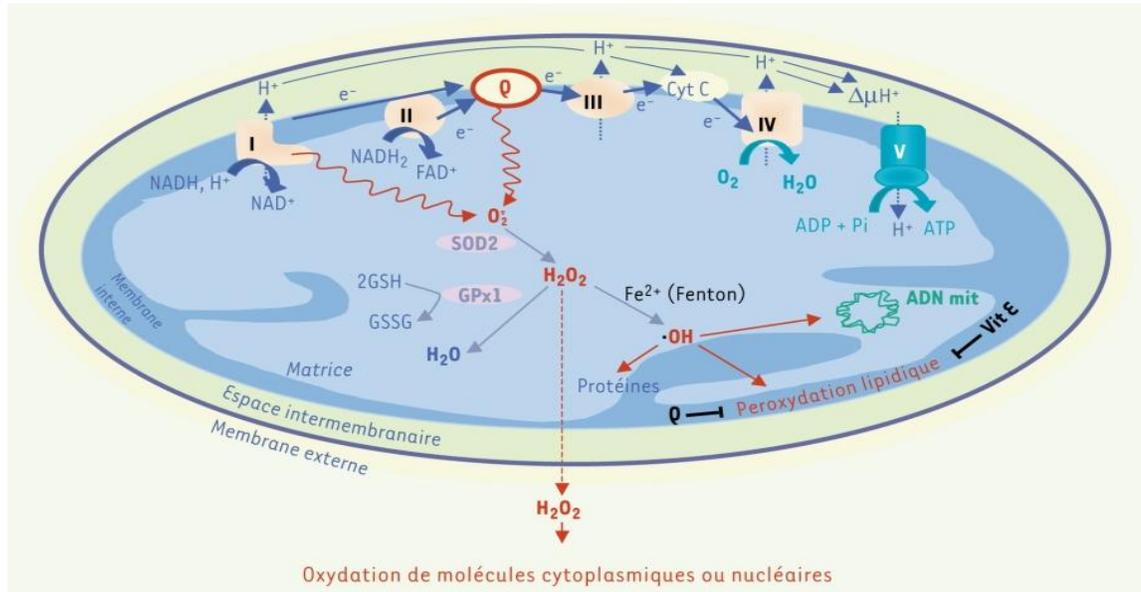


Figure2 : Production mitochondriale et prise en charge de l'anion superoxyde (Carriere et al., 2006).

I. 2.2. Peroxyde d'hydrogène(H_2O_2) :

Il est aussi appelé dioxyde de dihydrogène, ou eau oxygénée (Branger et al., 2007). Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 a 2 origines principales :

- La réaction de dismutation enzymatique du radical $O_2^{\cdot -}$ en présence du superoxyde dismutase (SOD)



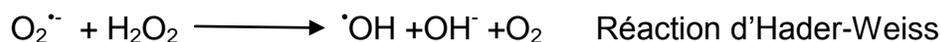
- Des réactions catalysées par des oxydases (aminoacides oxydases, glyoxylate oxydase, xanthine oxydase, urate oxydase ...), présentes surtout dans les peroxysomes.



H₂O₂ est très diffusible, mais peu réactif en absence de métaux de transition **(Moussard, 2006)**.

I.2.3. Le radical hydroxyle (OH[•]) :

Il est produit principalement à partir de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène en présence d'anion ferrique, au cours de la réaction d'Haber-weiss



Le radical hydroxyle possède une très grande réactivité dans les milieux biologique, pouvant se combiner avec de nombreuses molécules **(Lacolley, 2007)**.

Il peut oxyder un substrat selon 3 modes différents **(Moussard, 2006)**:

- par arrachement d'un électron, donnant un ion hydroxyle
- par arrachement d'un atome d'hydrogène sur un substrat
- par addition sur la double liaison d'un substrat

Le radical hydroxyle est donc un oxydant très puissant, constituant certainement le radical libre le plus toxique, en biologie et serait à l'origine de la production des radicaux libres secondaires, suite à sa réaction avec différents composés cellulaire **(Lacolley, 2007)**.

I.2.4. Le radical peroxyde (RO₂[•]) :

Le radical peroxyde RO₂[•] est issu de l'addition de O₂ sur des radicaux libres carbonés R[•] précédemment formés. Bien que moins réactif que OH[•], RO₂[•] peut, comme ce dernier, oxyder un grand nombre de molécules (par arrachement d'un électron, arrachement d'un hydrogène, addition sur une double liaison) . Il est, en particulier, au

cœur du processus de peroxydation lipidique qui dégrade les membranes biologiques (Moussard, 2006).

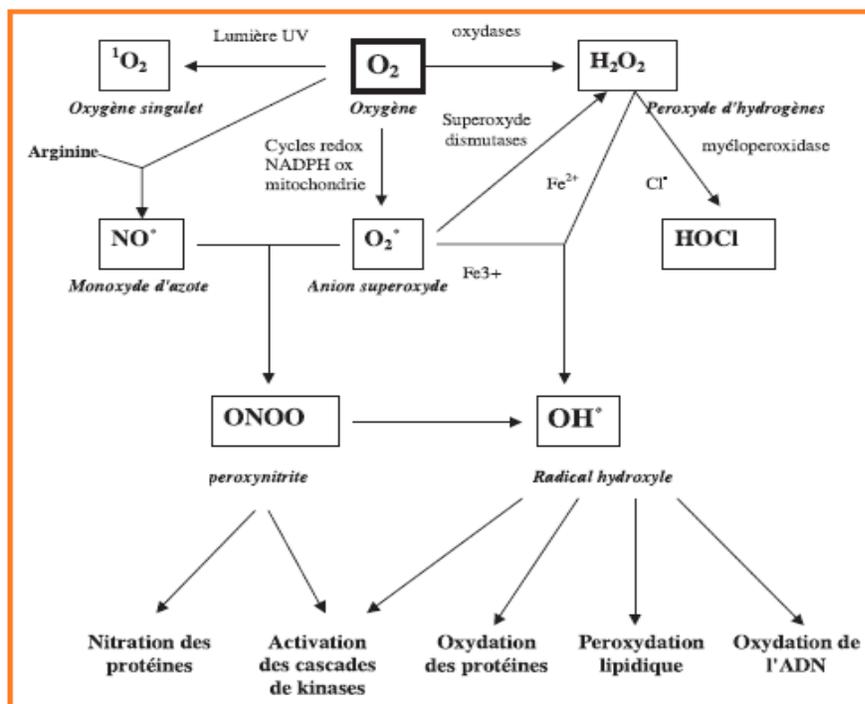


Figure3 : origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène en biologie (Favier, 2003).

I. 3. stress oxydant :

I. 3.1. Définition :

Le stress oxydant est communément défini comme un déséquilibre entre les systèmes oxydants et les capacités antioxydantes d'un organisme, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire (Barouki, 2006).

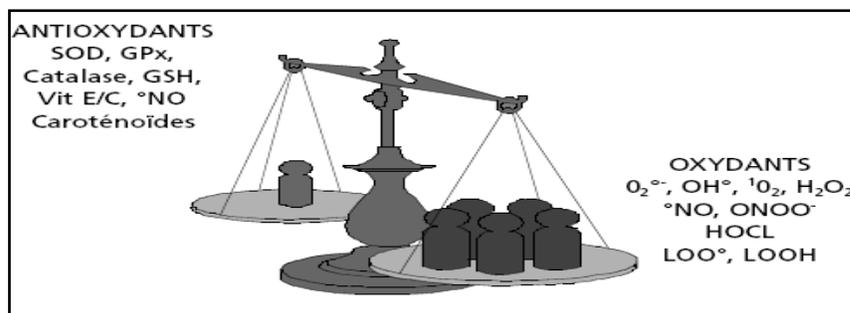


Figure 4 : Définition du stress oxydant (**Morena et al., 2002**).

I. 3.2. Conséquences du stress oxydant :

Les radicaux libres oxygénés (RLO) déclenchent souvent des réactions d'oxydation en chaîne. Ils peuvent donc devenir dangereux pour les cellules productrices et pour les cellules voisines.

Les RLO même en très faible quantité, provoquent la peroxydation des lipides membranaires, des altérations des protéines et de l'ADN, une rupture des processus mitochondriaux et cytosoliques, et la mort de la cellule (**Russo et al 1998**).

- **La peroxydation lipidique :**

Les lipides sont des cibles privilégiées des radicaux libres qui provoquent l'oxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) et des phospholipides membranaires (**Fulbert et al., 1992**).

La peroxydation lipidique se déroule en 3 phases :

-L'initiation : l'attaque par le radical $\cdot\text{OH}$ du groupement méthylène présent entre 2 doubles liaisons d'un AGPI produit un radical carboné $\text{R}\cdot$ (OH enlève un atome d'hydrogène du $-\text{CH}_2-$, puis les doubles liaisons subissent un réarrangement) ; en présence d' O_2 , $\text{R}\cdot$ est transformé en radical $\text{RO}_2\cdot$.

-La propagation : le radical $\text{RO}_2\cdot$ enlève un hydrogène à un nouvel AGPI voisin qui, à son tour, produira un radical $\text{RO}_2\cdot$: une réaction en chaîne s'installe. Au cours de ces réactions, les hydroperoxydes formés peuvent donner naissance à divers produits de

décomposition ou, en présence de métaux de transition, être à l'origine de la formation d'un radical alkoxylo RO^{\bullet} , ce dernier réagissant avec un nouvel AGPI entretient la propagation lipidique .

-La terminaison : la réaction entre 2 radicaux met fin à la réaction en chaîne (**Moussard, 2006**).

La figure ci-dessous explique les 3 phases de la peroxydation lipidiques :

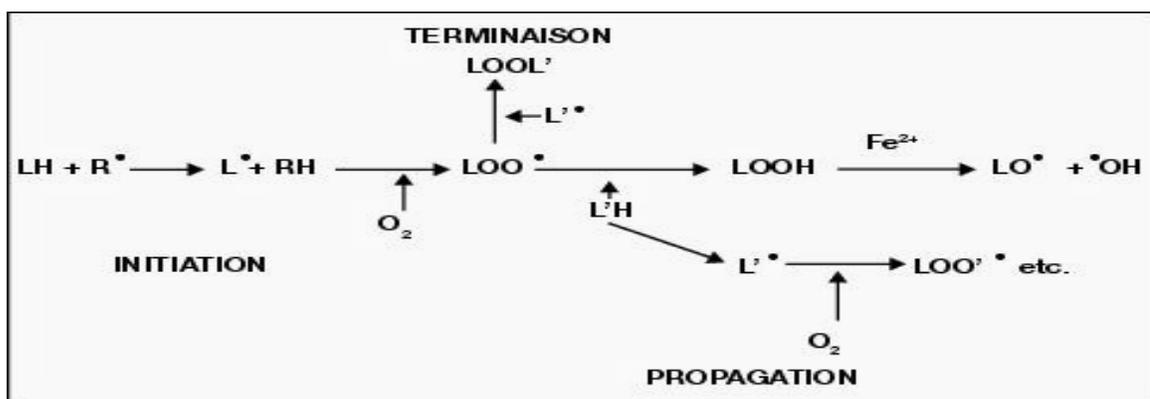


Figure 5 : Phases d'initiation, de propagation et de terminaison de la peroxydation lipidique. R^{\bullet} : radical initiateur (ERO) ; LH : acide gras polyinsaturé ; L^{\bullet} : radical lipidique ; LOO^{\bullet} : radical peroxylo ; LOOH : hydroperoxyde ; LO^{\bullet} : radical alkoxylo ; $^{\bullet}OH$: radical hydroxyle ; O_2 : oxygène ; LOOL : produit stable.

- **Oxydation des protéines :**

Il est maintenant prouvé que les protéines intra-et extracellulaires sont, in vivo, une cible des radicaux libres et d'autres systèmes oxydants. Les dommages créés sur les protéines sont de plusieurs types :

-oxydation des chaînes latérales des acides aminés ;

-oxydation au niveau de la chaîne peptidique suivie d'une fragmentation et/ou de la formation de liaisons croisées intra-ou intermoléculaires (**Delattre et al ., 2003**).

Si presque tous les acides aminés peuvent être oxydés par les RLO, les acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) et aromatiques (tyrosine et tryptophane) sont les plus sensibles.

• Oxydation de l'ADN :

Cinq classes principales de dommages oxydatifs médiés par $\text{OH}\cdot$ peuvent être générées. Parmi elles, les bases oxydées, les sites abasiques, des adduits intra-caténaires, des cassures de brins et des pontages ADN-protéines. Les bases qui composent l'ADN, et particulièrement la guanine, sont sensibles à l'oxydation. L'attaque radicalaire peut être directe et entraîner l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases oxydées : 8 oxo guanine, 8 oxo adénine, formamidopyrimidine, 8 oxo adénine, formimido uracile, 5 hydroxy cytosine, 5 hydroxy méthyl uracile, thymine diol, oxazolone (**Favier, 2003**).

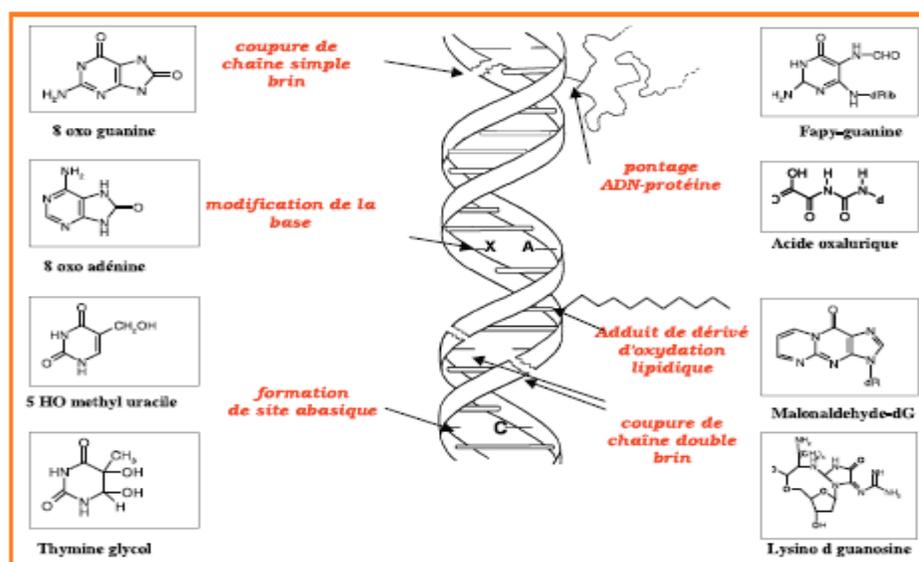


Figure 6 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (**favier 2003**)

I.3.3. Pathologie liées au stress oxydant :

Si le stress oxydant n'est pas une maladie en soi, il constitue un terrain favorable au développement de pathologies diverses (**Defraigne et al ., 2007**).

Le stress oxydant est impliqué dans le développement de plus de 200 pathophysiologie : allant de l'athérosclérose au cancer en passant par le diabète, le Sida ou toutes les maladies inflammatoire (arthrite rhumatoïde, endotoxémie)

(Pincemail et al., 2001), certaines maladies oculaires et le vieillissement (Berger, 2006).

- **Le vieillissement :**

Le vieillissement est un processus physiologique inévitable (Philippe, 2006), il s'accompagne d'une altération globale d'un ensemble de fonctions physiologiques ainsi que d'une susceptibilité plus élevée face à différentes maladies. La théorie radicalaire « HARMAN 1956 » explique ces altérations par l'accumulation de molécules oxydées et par les conséquences de cette oxydation comme l'apparition de mutation, la carbonylation des protéines leur dénaturation et leur agrégation, l'oxydation des lipides et l'augmentation des AGE (Barouki, 2006).

- **le cancer :**

Les radicaux libres produits par la respiration cellulaire est augmentes lors de stress oxydatifs, sont à l'origine de phénomène d'oxydation responsable de dommages cellulaires pouvant conduire à une transformation cancéreuse de la cellule (Michel B, 2008).

Le cancer se présente habituellement comme une tumeur formé d'une masse cellulaire qui est l'aboutissement d'une série de transformation pouvant se dérouler sur une période de plusieurs années. La cancérogénèse est donc un processus complexe multiséquentiel menant une cellule de l'état sain à un état précancéreux et, finalement à un stade précoce de cancer. Le développement du cancer se divise en trois grande étapes (initiation, propagation et progression) dans les quelles le stress oxydatif est impliqué. A l'état d'initiation les espèces oxygénées activés (EOA) altèrent le matériel génétique des cellules et induit des mutations lors de la réplication de l'ADN.

II.1. Définition :

Les antioxydants au sens large représentent l'ensemble des molécules susceptibles d'inhiber directement la production, de limiter la propagation ou de détruire les espèces actives de l'oxygène. Ils peuvent agir en réduisant ou en dismutant ces espèces, en les piégeant pour former un composé stable, en séquestrant le fer libre ou en générant du glutathion (**Favier, 2003**).

Les antioxydants sont des molécules capables de réagir en s'oxydant au niveau intracellulaire avec les radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène et ainsi de protéger les éléments cellulaires (en particulier les acides nucléiques, les protéines et les membranes lipidiques) de lésions secondaires au stress oxydant (**Paule et al., 2012**).

II.2-classification des antioxydants :

Notre organisme est équipé de tout un système complexe de défense antioxydant enzymatiques et non enzymatiques, localisé dans les compartiments intra- et extracellulaire (**Berger, 2006**).

Les antioxydants sont subdivisés en antioxydants naturels et synthétiques :

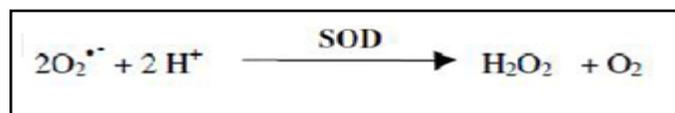
II. 2-1-les antioxydants naturels :

II. 2-1-1-les antioxydants primaires :

Ce sont des enzymes qui participent à la neutralisation excédentaire des radicaux libres : l'enzyme **superoxyde** dismutase (SOD), le glutathion peroxydase, catalase.

a. les superoxydes dismutases(SOD) :

Les superoxydes dismutases sont des metalloenzymes capablent de dismuter l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) en peroxyde d'hydrogène, moins réactifs (**Pelletier et al., 2004**).



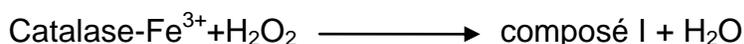
Chez l'homme, trois isoformes compartimentées de l'enzyme SOD ont été caractérisées de façon biochimique et moléculaire (**Afonso et al., 2007**) :

- La SOD1, dont le site actif contient du cuivre et du zinc (Cu, Zn-SOD) et qui est essentiellement présente dans le cytosol, présente une masse moléculaire d'environ 32000DA (**Delattre et al ., 2003**).
- La SOD2, dont le site actif contient du manganèse (Mn- SOD), sa masse moléculaire est de 40000Da (**Delattre et al., 2003**). Est qui est uniquement mitochondriale(**Astrid., et al 2007**).
- La SOD3 a cuivre et zinc surtout présente dans la matrice extracellulaire des tissus. Il s'agit d'une glycoprotéine tétramérique de masse moléculaire 13500DA, chaque sous unités comportant un atome de cuivre et un atome de zinc. Elle existe sous plusieurs formes (A, B et C), B et C se lient à l'héparine. (**Delattre et al ., 2003**)

b. les catalases :

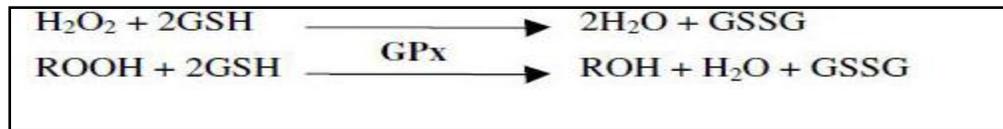
Les catalases sont des enzymes qui permettent de transformer le peroxyde d'hydrogène en oxygène moléculaire et en eau. Elles sont localisées à l'intérieur des peroxysomes exclusivement. (**Lacolley, 2007**). La catalase comporte quatre sous unités protéiques, chacune contenant un groupement hémique avec Fe^{3+} lié au site actif. Chaque molécule a habituellement une molécule de NADPH qui lui est liée.

La réaction catalysée par cette enzyme consiste en une dismutation d' H_2O_2 :



c. Les glutathions peroxydases et réductases (GSHPX) :

Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries. Le rôle de la glutathion peroxydase (GPx) est de réduire d'une part le peroxyde d'hydrogène en molécule d'eau, et d'autre part les hydroperoxydes organiques (ROOH) en alcools. Lors de cette réaction, qui demande l'intervention de deux molécules de glutathion (GSH), celles-ci se transforment en glutathion-disulfure (GSSG).



La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG. Au cours de cette réaction, la glutathion réductase utilise un cofacteur, le NADPH: (**Kanoun , 2011**).

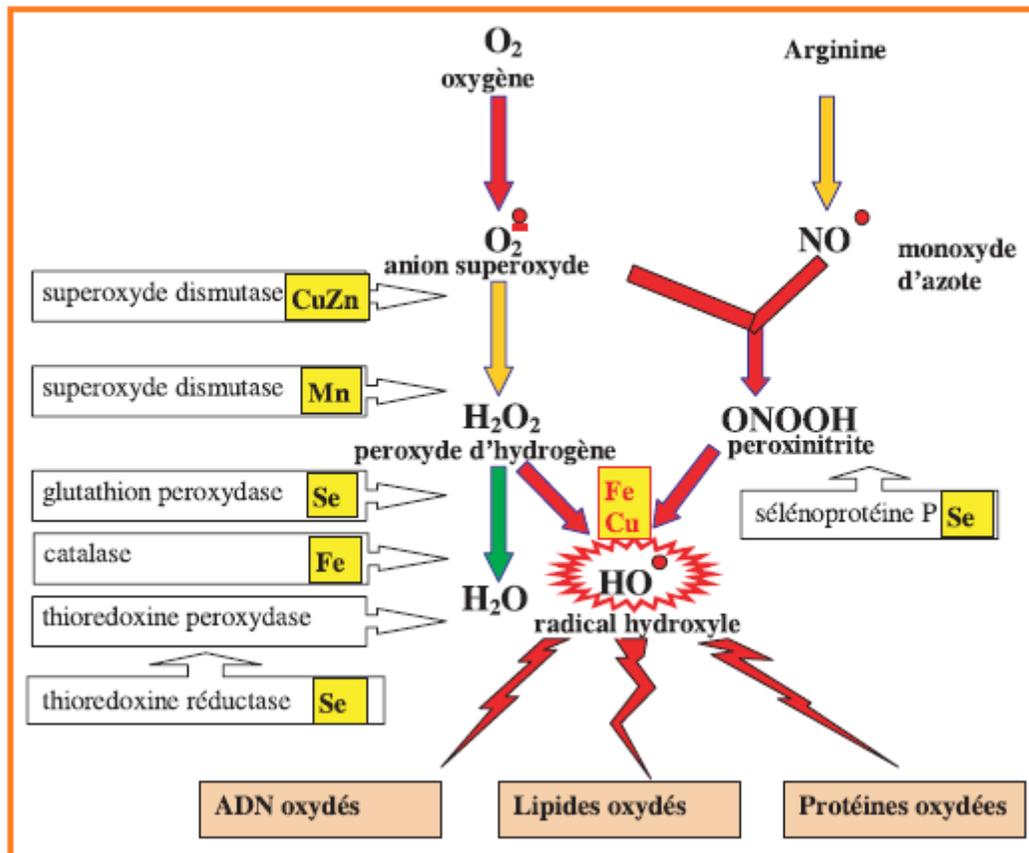
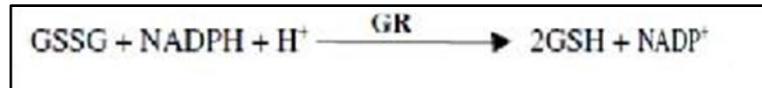


Figure7 : Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques (**Favier, 2003**)

I.2-1-2-les antioxydants secondaires :

Se sont des piègeurs des radicaux libres non enzymatiques, qui peuvent prendre en charge la détoxification d'un grand nombre de radicaux libres et notamment celle du radical hydroxyle contre lequel aucun système enzymatique n'existe (**Lacolley, 2007**).

Les antioxydants secondaires sont apportés par l'alimentation dans cette catégorie nous retrouvons les vitamines C, les vitamines E, les polyphénols, les caroténoïdes et les oligo-éléments.

a. Les Vitamines :

Les vitamines sont des substances organiques, sans valeur énergétiques propre, qui sont nécessaire à l'organisme et que l'homme ne peut synthétiser en quantité suffisante. Elles doivent donc être fournies par l'alimentation (**Bourgeois, 2003**).

Parmi les défenses antioxydantes, les vitamines jouent un rôle essentiel au cours du vieillissement. Elles interviennent dans l'immunité, les fonctions cognitives, la protection contre les maladies cardiovasculaires, les cancers et les cataractes (**Roussel et al., 2002**).

• La vitamine E :

La vitamine E désigne un groupe de nombreux composants présents dans la nature : les α , β et γ tocophérols et tocotriénols (**Paul et al, 2000**).la vitamine E est un puissant antioxydant liposoluble (**Tarber et al, 2008**).les rôles fondamentales des tocophérols sont la protection antioxydante de la surface des lipoprotéines et des membranes cellulaires, le γ tocophérol est capable de piéger les peroxy-nitrites, particulièrement dangereux pour les neurones , la vitamine E est régénérée par l'acide ascorbique ou le glutathion(**Moreau,1993**).

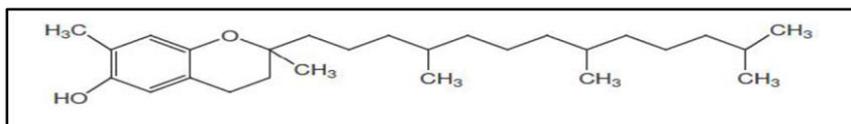


Figure8 : Structure de la vitamine E

- **La vitamine C :**

La vitamine C ou l'acide ascorbique est l'antioxydant hydrosoluble majeur (**Curtay et al, 2000**). Elle est présente dans les lipides extracellulaires ainsi que dans le cytosol (**Jacques, 2003**). La vitamine C piège directement les radicaux libres comme $O_2^{\cdot -}$. De plus, à faible concentration, elle piège les radicaux peroxydes (**Pierre Moreau, 1993**). Une propriété importante de l'ascorbate est la réparation de deux autres antioxydants, le glutathion et l' α tocophérols à partir de leur formes radicalaires (**Gardés et al .,2003**).

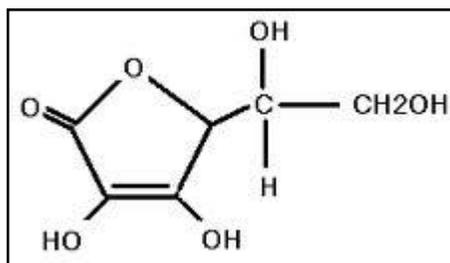


Figure9: Structure de la vitamine C

- **Les caroténoïdes :**

Les caroténoïdes, dont font partie le β -carotène et le lycopène, piègent l'oxygène singulet, grâce à leur structure très riche en double liaisons. Le β -carotène est aussi capable de piéger des radicaux peroxyde et protège ainsi les LDL (**Delattre et al .,2003**).

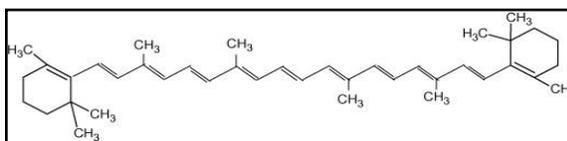


Figure10: structure de β -carotène (**Saliva et al ., 2011**)

b. les oligoéléments :

Les oligoéléments sont des co-facteurs de divers enzymes à activité antioxydante. Parmi ces oligoéléments on cite ; le zinc, le cuivre et le sélénium :

- o Le sélénium joue un rôle clé dans la protection des cellules et de leurs constituants contre l'attaque radicalaire. Cette fonction est due à sa présence dans le site actif de glutathion peroxydases séléno-dépendantes et à l'activité biologique anti-radicalaire des sélénoprotéines (**Roussel et al, 2002**).

- Le cuivre et le zinc font partie intégrante du site actif du superoxyde dismutase **(Pincemail et al, 1998)**.
- Le zinc exerce une action antioxydante par le biais de plusieurs mécanismes. Il protège de l'oxydation les groupes sulfhydryls de certaines protéines il peut avoir un effet antioxydant direct en captant les radicaux OH^{\cdot} , il a une action indirecte en entrant en compétition avec le fer et avec le cuivre **(Astrid et al., 2007)**. En outre il existe un fameux effet de synergie entre la plupart des vitamines antioxydantes et des oligoéléments **(Pincemail et al, 2002)**.

c. les composés phénoliques :

Les composés phénoliques forment un très vaste ensemble de substance qu'il est difficile de définir. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside **(Bruneton, 1999)**.

▪ Classification:

Les composés phénoliques ont été classés par plusieurs auteurs. Parmi les classifications les plus utilisées, nous citons celle de **Derbel et Ghedira (2005)** qui ont divisé les composés phénoliques en quatre classes (les flavonoïdes, les anthocyanes, les tanins et les stilbènes). Celle de **Macheix (2005)** qui a divisé les composés phénoliques selon le nombre d'atome de carbone du squelette de base, en molécules simples (acide phénoliques, coumarines, stilbènes, et flavonoïdes) et en molécules complexes (lignines et tanins).

1. Formes simples :

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

1. 1. Les acides phénoliques :

Le terme d'acide phénolique peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique **(Bruneton 1999)**. Ils sont constitués de deux groupes :

1. 1.1. Acides hydroxybenzoïques :

Les acides hydroxybenzoïques (acide vanillique, gallique, syringique ...) sont dérivés de l'acide benzoïque et ont une formule de base de type C₆-C₁ (**Macheix et al., 2005**).

1. 1.2. Acides hydroxycinnamiques :

Les acides hydroxycinnamiques représentent une classe très importante dont la structure de base (C₆-C₃) dérive de celle de l'acide cinnamique (**Macheix et al., 2005**).

1. 2. Les hydrocoumarines :

Sont des dérivées des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale, elles sont également très nombreuses chez les végétaux, soit sous formes libres (umbelliférone, esculétine) soit sous forme plus complexes (forme glucosylées). Elles ont fréquemment un rôle écologique ou biologique (**Macheix et al., 2005**).

1. 3. Les stilbènes :

Ils dérivent aussi des acides hydroxycinnamiques, par exemple le resvératrol qui apparaît chez la vigne en réponse à des attaques parasitaires (**Macheix et al., 2005**).

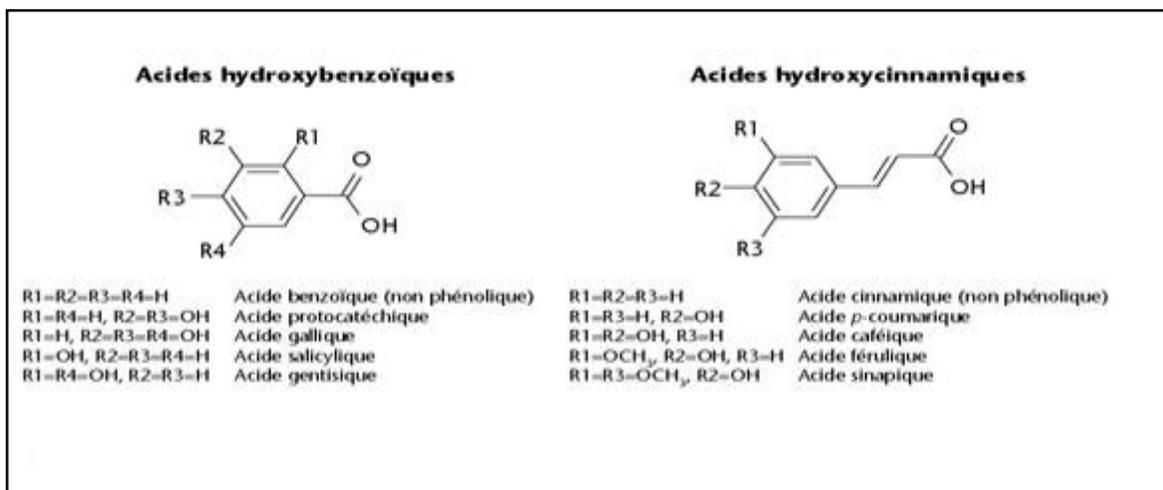


Figure 11 : principaux acides phénoliques (**Macheix et al, 2005**).

1. 4. les flavonoïdes :

Les flavonoïdes constituent le groupe le plus large des composés phénoliques des végétaux, représentant plus de la moitié des huit milles composés phénoliques naturels. La structure générale en C₁₅ (C₆-C₃-C₆), elle se compose de deux cycles aromatiques A et B liés par un hétéroxyle contenant un oxygène (**Balasundram et al., 2006**).

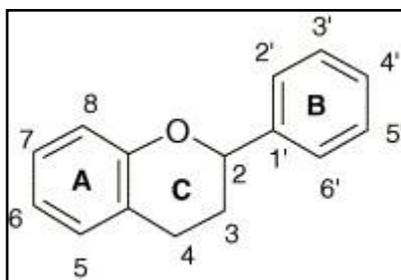


Figure 12 : Structure de base des flavonoïdes (**Derbel et al., 2005**)

Des variations dans des modèles de substitution dans le cycle C a pour résultat les principales classes de flavonoïdes, c'est-à-dire les flavones, les flavonols, les flavanes, les flavonones et les antocyanidines, dans lesquelles : les flavones et les flavonols sont les plus répandues et structurellement diverses.

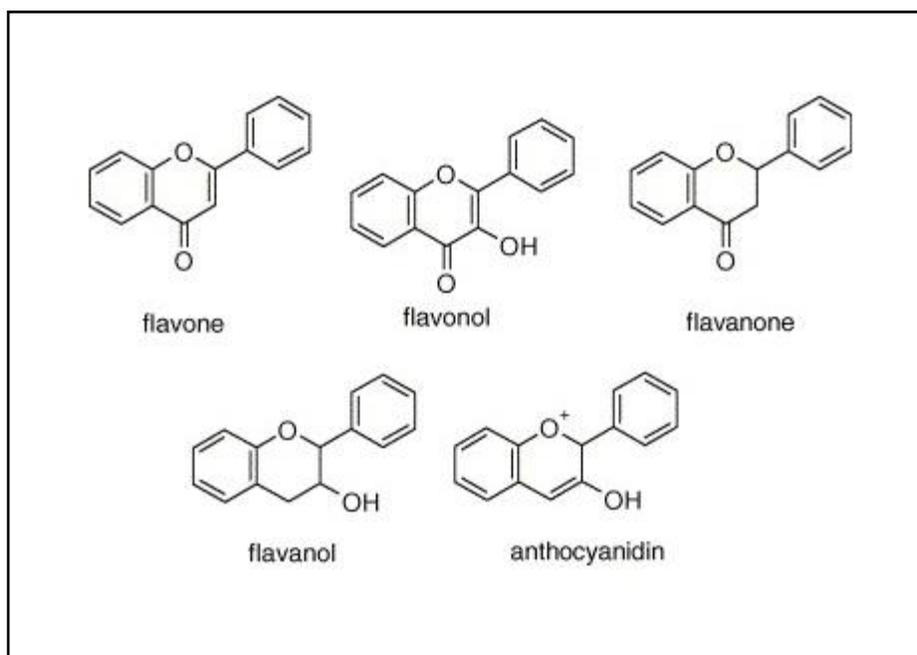


Figure13 : Structure des majeures classes des flavonoïdes (**Balasundram et al., 2006**).

2. Formes condensées :

Ces composés résultent généralement de la condensation de certaines des formes simples. Selon la nature des constituants impliqués et selon le type de condensation, on obtient des composés plus ou moins complexes (**Macheix et al, 2005**).

2. 1. les tanins :

Les tanins sont des composés phénoliques de poids moléculaires élevé produit par le métabolisme secondaires des plantes. Les tanins sont divisés en tanins condensés et tanins hydrolysables (**Bossu et al., 2006**).

2. 1.1. les tanins condensés :

Se sont des polymères flavaniques. Ils ont constitués de flavan-3-ols liés entre eux par des liaisons carbone-carbone (**Bruneton,1999**).

2. 1.2. les tanins hydrolysables :

Ce sont des esters d'un sucre (généralement le glucose) ou d'un polyol et d'un nombre variable de molécules d'acide phénol (**Roux et al ,2007**). L'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des tanins galliques, soit de l'acide hexahydroxydiphéniques (HHDP) et ses dérivés d'oxydation dans le des tanins ellagique (**Bruneton,1999**).

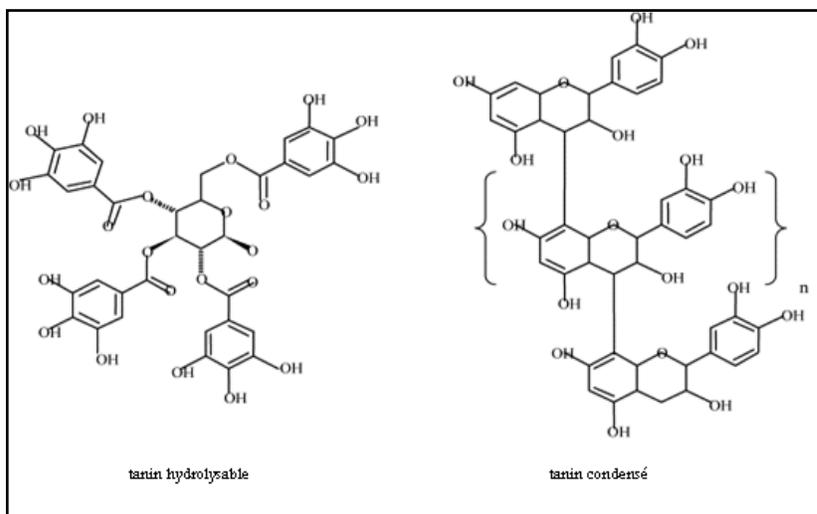


Figure14 : Exemple de structure d'un tanin condensé et hydrolysable

2. 2. La lignine

La lignine représente une biomasse considérable produite annuellement par les végétaux, la deuxième après la cellulose. Selon les espèces, elle constitue 15 à 35% du bois des angiospermes et des gymnospermes (**Macheix et al, 2005**). Elles jouent un rôle important dans les fonctions de soutien, de conduction et de défense contre l'attaque des champignons et des insectes.

▪ Rôle des polyphénols comme antioxydant :

Les composés phénoliques peuvent agir comme des antioxydants de différentes manières. Dans les systèmes utilisant l'oxydation des métaux de transition tels que le cuivre et le fer, ils peuvent chélater ces ions métalliques, qui sont des initiateurs des réactions de Fenton pouvant générer de fortes concentrations en radical hydroxyle. Toutefois, l'activité antioxydante la plus importante est liée à la capacité anti-radicalaire, en brisant la chaîne des réactions déclenchées par les radicaux libres (**Benlemlih et al**).

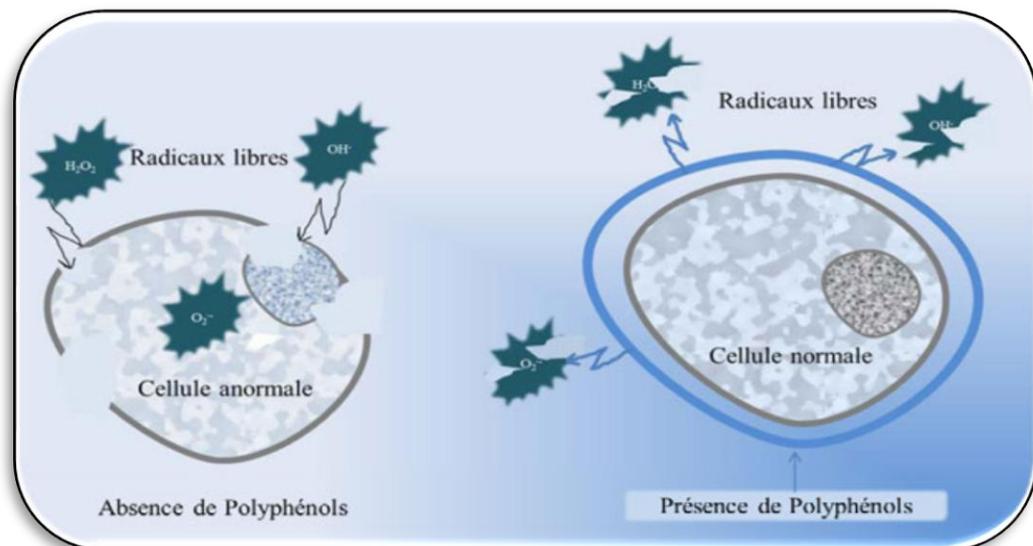


Figure 15: Schéma explicatif de l'effet protectif des polyphénols contre les radicaux libres (**Benlemlih et al**).

▪ l'activité biologique des polyphénols :

La consommation d'aliments riches en polyphénols réduit le développement de nombreuses pathologies, telles que le cancer, l'ischémie cardiaque, l'athérosclérose et l'hypertension. Cela peut-être expliqué par le fait que ces composés ont la capacité de modifier de nombreux facteurs impliqués dans la genèse de ces maladies.

Les polyphénols sont en effet capables d'abaisser la pression artérielle chez le rat, d'empêcher l'oxydation des LDL d'inhiber la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires, d'empêcher l'agrégation plaquettaire, de stabiliser les cellules immunitaires et de promouvoir le relâchement des cellules musculaires lisses vasculaires. Ils ont ainsi été décrits comme étant des antioxydants, des anti-agrégants plaquettaires, des anti-inflammatoires, des anti-allergènes, des anti-thrombotiques et des anti-tumoraux (**Martin et Andrantsitohaina,2002**).

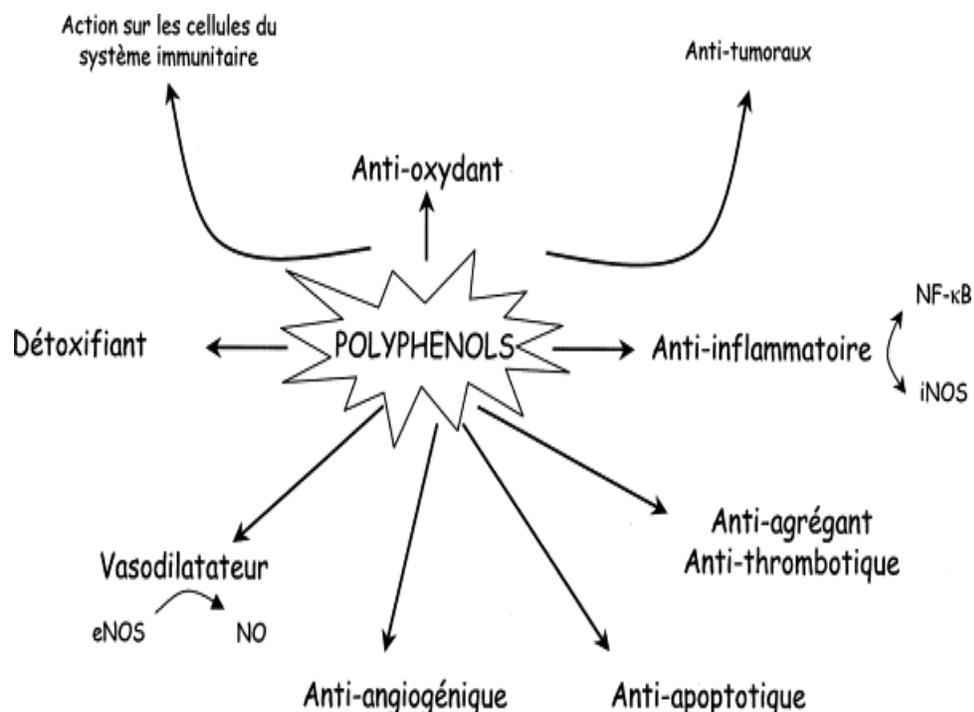


Figure 16: Effets biologiques des polyphénols. eNOS, NO synthase endothéliale ; NO synthase inductible ; NF-κB, facteur nucléaire –κB.

II. 2.1.3. les antioxydants tertiaires :

Composé de phospholipases d'ADN endonucléases et ligases et de macroxyproteinases empêche l'accumulation dans la cellule de lipides, d'ADN et de protéines oxydés et participe à l'élimination de leurs fragments toxiques (**Pincemail et al, 2002**).

II.2. 2. Les antioxydants synthétiques :

Pour une utilisation pratique, les antioxydants doivent remplir les conditions suivantes : ils ne doivent pas être toxiques, ils doivent être hautement actifs à de faible concentration (0.01-0.02%) et être présent à la surface ou dans la phase grasse de l'aliment.les antioxydants synthétiques les plus fréquemment utilisés dans l'industrie alimentaire : butylhydroxyanisole(BHA), butylhydroxytoluène (BHT) gallate propylée (PG) (**Bauer et al ., 2010**).

I.3. Les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante :

De manière générale, les méthodes d'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante s'articulent autour de quatre composantes :

1 / Un substrat oxydable dont la dégradation oxydative peut être suivie par des méthodes physico-chimiques ou sensorielles.

2/ Un milieu, permettant la mise en contact des différentes composantes.

3/ Des conditions d'oxydation, permettant d'oxyder le substrat.

4/ des substances antioxydantes, dont on souhaite évaluer l'aptitude à protéger le substrat oxydable.

La mesure du potentiel antioxydant et le suivi des processus d'oxydation sont abordés globalement en déterminant des produits résultant de l'oxydation ou en évaluant l'aptitude à piéger des radicaux de modèles réactionnels (**Marc et al., 2004**)

1- Evaluation de produits résultant de l'oxydation :

Ce mode est plus ancien, nécessite une connaissance préalable des composés issus de l'oxydation. En effet ces méthodes recherchent certains groupements fonctionnels (aldéhydes, cétones, dicarboyles...) dans les dérivés des constituants d'origine. Le dosage des produits formés (en particulier les hydroperoxydes) est effectué par des techniques photométriques.

2- Evaluation de l'aptitude du composé à piéger des radicaux libres :

La capacité du produit à piéger les radicaux libres et donc à ralentir ou inhiber, aussi bien les phases d'inhibition que de propagation, implique la création des radicaux.

Exemples de ces méthodes :

- TEAC (trolox équivalent antioxidant capacity)
- ORAC (oxygen radical absorbance capacity)
- La méthode utilisant le radical stable DPPH
- La mesure de l'aptitude à réduire le Fe^{3+} en Fe^{2+} .

III.1. Définition :

La pharmacopée française (1965) donne une définition officielle des huiles essentielles (essences, huile volatiles) :

« Produits de composition généralement assez complexe renfermant les principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation. Pour extraire ces principes volatils, il existe divers procédés. Deux seulement sont utilisables pour la préparation des essences officinales : celui par distillation dans la vapeur d'eau de plantes à essence ou de certains de leurs organes, et celui par expression »

La norme AFNOR NFT75-006 (février 1998) a donné la définition suivante d'une huile essentielle :

« Produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des citrus, soit par distillation sèche. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques pour les deux changements significatifs de sa composition [par exemple, redistillation, aération] **(Bruneton, 1999)**.

III.2. Propriétés physiques :

Les huiles essentielles possèdent en commun un certain nombre de propriétés physiques **(Roux et al ,2007)** :

- Elles sont généralement liquides à la température ordinaire.
- Elles sont volatiles et entraînables à la vapeur d'eau.
- Elles sont généralement incolores.
- Leur densité est généralement inférieure à 1.
- Elles sont insolubles dans l'eau mais lui communiquent leur odeur.
- Elles sont solubles dans la plupart des solvants organiques et dans les huiles fixes.
- Elles sont sensibles de l'oxydation et donc de conservation limitée.

III.3. Composition chimiques :

Ce sont des mélanges complexes et variables de constituants appartenant de façon quasi-exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines bioénergétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquent d'autre part (Bruneton. 1993).

III.3.1. Terpénoïdes :

Dans le cas des huiles essentielles, seuls seront rencontrés les terpènes les plus volatils : mono-et sesquiterpènes (Bekhechi et al., 2010).

III. 3.1.1. les monoterpènes :

Constituant les plus simples de la série, les monoterpènes sont issue du couplage de deux unités « isopréniques ». Ils sont acycliques, monocycliques ou bicycliques. Les monoterpènes constituent 90% de l'huile essentielle (citrus...).les variations structurales justifient l'existence de nombreuses molécules : alcools (géraniol, bornéol), phénols (thymol), aldéhydes (citronellal), cétones (carvone), esters (acétate de cédryle), éthers (1,8-cinéole).

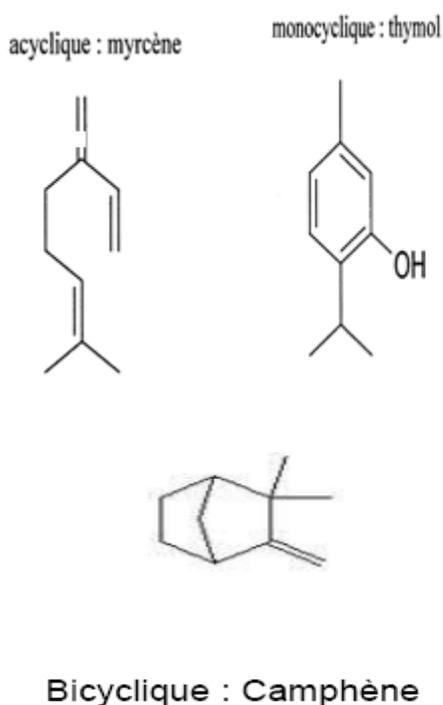


Figure 17 : Exemple des composants monoterpènes

III.3.1.2. les sesquiterpènes :

Sont des constituants habituels des huiles essentielles des végétaux supérieurs, ils peuvent intervenir dans les propriétés pharmacologique attribuées à ces fractions volatiles.

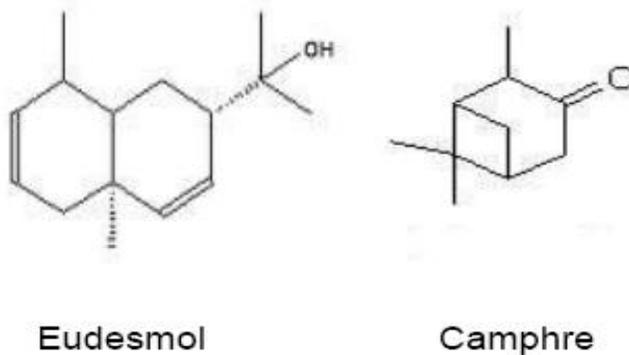


Figure 18 : Exemple des composants sesquiterpéniques

III.3.2. Composés aromatiques :

Dérivés du phénylpropane (C_6-C_3), ils sont beaucoup moins fréquents que les précédents. Un noyau aromatique est couplé à une chaîne de trois carbones (Bruneton, 1993).

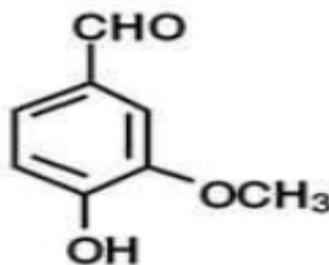


Figure 19: La vanilline

III.3.3. Composés d'origine divers :

Lors de la préparation des huiles essentielles, certains composés aliphatiques, de faible masse moléculaire, sont entraînés lors de l'hydrodistillation (carbures,

acides alcools, aldéhydes, esters ...) (Bruneton, 1993). Les différents composés sont assez stables aux températures ambiantes.

III.4. Localisation des huiles essentielles :

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs, il ya environ 500 000 plantes sur terre ; environ 10 000 d'entre elles, possèdent des propriétés médicinales (**Encyclopédie, 2001**).

Les huiles essentielles sont fabriquées à partir des sucres issu de la photosynthèse, par des cellules spécialisées (ou sécrétrices) située le plus souvent dans les fleurs et les feuilles. Mais il est aussi possible d'utiliser le fruit, le bois ou encore la racine du végétale considérée. L'huile essentielle est un extrait pur et naturel de la partie odoriférante des plantes aromatiques (**Michel et al., 2007**).

Chez les Ombellifères, racine, tige et feuilles sont parcourues, par des canaux sécréteurs qui contiennent un mélange d'essence et de résine. Ils sont surtout abondants dans les tiges, où l'on trouve en particulier un canal au niveau de chacune des cannelures, ces canaux expliquent l'odeur forte qui se dégage des Ombellifères lorsqu'on les écrases (**Bekhechi et al., 2010**).

III.5. Rôle dans la plante :

Les huiles essentielles sont extraites des végétaux. Ces dernières les fabriquent pour se protéger, se soigner, se réparer, elles leur servent à séduire les insectes pollinisateurs, se protéger des bruleurs du soleil ou du froid, des prédateurs et des maladies, et enfin à guérir (blessures, maladies, attaque diverses...). Pour résumer, les plantes survivent grâce à leur huile essentielle (**Danièle Festy, 2010**).

III.6. Propriétés antimicrobiennes :

Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celles des moisissures et des levures. Leur activité antimicrobienne est principalement en fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs. Elles agissent en empêchant la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines. Pour les levures, elles agissent sur la biomasse et la production des

pseudomycelium alors qu'elles inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures.

III.7. Les méthodes d'extractions :

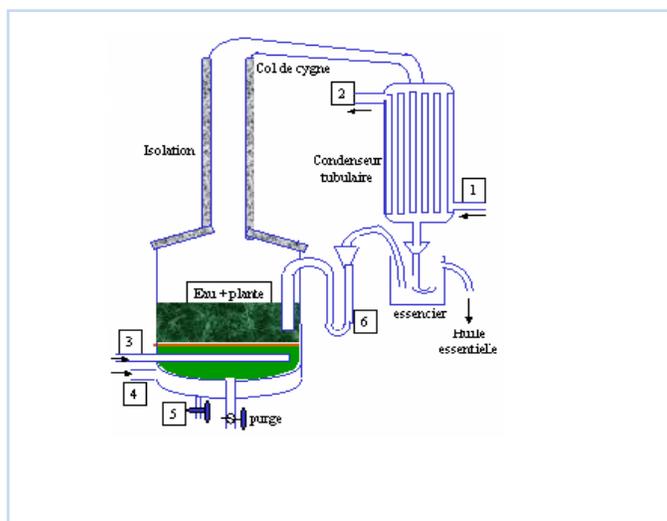
L'extraction des huiles essentielles est une opération capitale qui doit permettre d'obtenir des produits volatiles, particulièrement fragiles, sans en altérer la qualité. Si de nombreux procédés, qui ne sont pas évoqués ici, peuvent être utilisés pour leur extraction seul deux modes d'obtention sont autorisés par la pharmacopée française : l'expression et la distillation.

III.7.1. La Distillation :

La distillation est sans doute la méthode la plus employée pour extraire les essences des plantes ou des sécrétions résineuses (**Saika Kone, 2001**). Dans l'industrie, il existe trois méthodes de base pour l'extraction des huiles essentielles :

III.7.1.1. Distillation par l'eau ou « hydrodistillation » :

Cette méthode consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (intact ou éventuellement broyé [Turbodistillation]) dans un alambic rempli d'eau distillée qui est ensuite portée à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité (**Bruneton, 1999**).

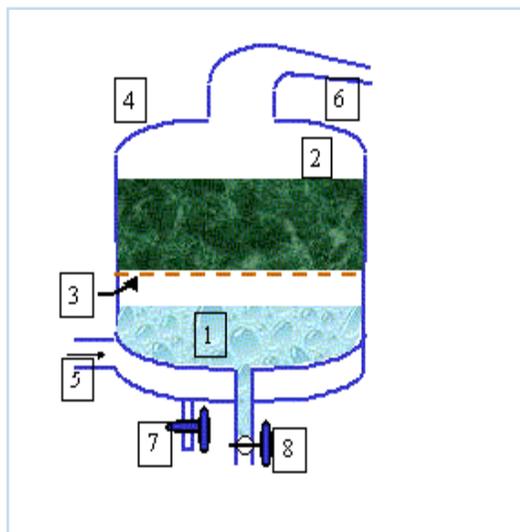


Légende: 1: Entrée d'eau froide pour le condenseur; 2: Sortie d'eau du condenseur; 3: Alimentation en eau de la " partie chaudière de l'alambic"; 4: Admission de la vapeur surchauffée dans la double enveloppe pour la production de vapeur dans la "partie chaudière"; 5: Purge de la double enveloppe; 6: Système pour cohobation (recyclage des eaux blanches) éventuellement.

Figure 20 : Coupe schématique d'un alambic pour l'hydrodistillation ; Chauffage indirect (injection de vapeur surchauffée) (**Benjlali, 2004**).

III. 7.1.2. Entrainement à la vapeur d'eau ou « Vapo-hydrodistillation » :

Dans ce procédé amélioré un grillage sépare la matière première à traiter de l'eau portée à ébullition au fond de réacteur. La vapeur d'eau en traversant le matériau emporte avec elle l'essence recherchée. Le mélange vapeur essence est ensuite récupéré par condensation (**Saika Kone, 2001**).



Légende

1- eau; 2-matériel végétal; 3-tôle perforée; 4-couvercle; 5-vapeur surchauffée; 6-col de cygne (conduite vers le condenseur; 7-purge du fond chauffant; 8-purge de l'alambic.

Figure23 : Coupe schématique d'un alambic pour la vapo-hydrodistillation. Le chauffage est assuré par injection de vapeur surchauffée produite séparément (**Benjilali, 2004**).

III.7.1.3. Distillation à la vapeur directe génération séparé ou « vapo distillation » :

Ce procédé d'extraction ne porte pas d'eau au fond de l'alambic. La vapeur saturée ou surchauffée à pression généralement supérieure à la pression atmosphérique est introduite au fond de l'alambic par un système de conduite et traverse la matière végétale de bas en haut. La vapeur provient d'une chaudière indépendante.

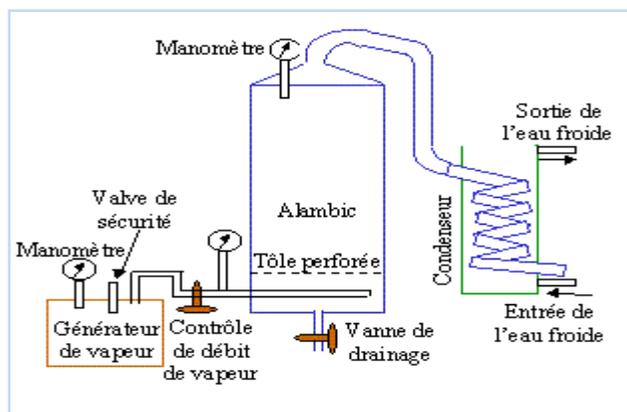


Figure 24. Schéma d'un appareil de distillation des plantes aromatiques à générateur de vapeur séparé de l'alambic (vapodistillation) (Benjlali, 2004).

III. 7.2. Expression à froid :

Elle constitue le plus simple des procédés, mais ne s'applique qu'aux agrumes dont l'écorce des fruits comporte des poches sécrétrices d'essence. Ce procédé consiste à broyer, à l'aide de presses, les zestes frais pour détruire les poches à fin d'en libérer l'essence, cette technique uniquement mécanique limite l'oxydation car elle conserve les antioxydants naturels contenus dans la fraction non volatile de l'essence (α et γ tocophérol (Roux et al., 2008))

IV.1. Objectif du travail :

L'objectif de ce travail est l'extraction des huiles essentielles par une hydrodistillation de (type Clevenger) et des composés phénoliques par le soxhlet de « *Thapsia garganica L* » provenant des deux régions (Blida et Bejaia), tout en comparant leurs rendements, leurs activités antioxydantes par plusieurs méthodes (DPPH, FRAP, β -carotène) ainsi que leurs activités antimicrobiennes.

IV.2. Lieux d'expérimentation :

Notre étude a été réalisée dans les laboratoires suivants :

- L'extraction des huiles essentielles et des extraits phénoliques de la plante étudiée, et l'étude de leurs activités antioxydantes ont été faite au niveau de laboratoire de recherche sur les produits bioactifs et la valorisation de la biomasse de l'ENS à Kouba.
- L'étude de l'activité antimicrobienne a été réalisée au sein de laboratoire d'hygiène et de contrôle alimentaire de la wilaya de Blida.

IV.3. Matériel chimique :

Les produits chimiques et utilisés dans notre recherche sont présentés dans le tableau n° :2

Tableau n°2 : Les produits chimiques utilisés pour la réalisation de travail

Produits chimiques	
L'extraction des huiles essentielles et des extraits phénoliques	
solvant	<ul style="list-style-type: none"> - Dichlorométhane - Méthanol - Butanol - Chloroforme
Autre produits	<ul style="list-style-type: none"> - Chlorure de sodium - Sulfate de calcium - CaCl_2 - Pierre ponce

Dosage des phénols totaux	
<ul style="list-style-type: none"> - Acide gallique - Folin ciocalteu - Carbonate de sodium 	
Activité antioxydante	
DPPH	<ul style="list-style-type: none"> - DPPH - l'éthanol - BHT, BHA, acide ascorbique (vit C)
B-carotène	<ul style="list-style-type: none"> - B-carotène - Tween 40 - Acide linoléique
FRAP	<ul style="list-style-type: none"> - Solution tampon 6.6 - Ferricyanure de potassium - Acide trichloracétique - Chlorure ferrique
Activité antimicrobienne	
<ul style="list-style-type: none"> - Milieu de culture : Muller Hinton (MH), Sabouraud - Tween 80 - Disque vierge 	

IV.4. Matériel végétal :

IV. 4.1. Appellation et Noms vernaculaires :

Thapsia est dérivé de Thapsos, île au large de la Sicile, où croissait une espèce proche de celle-ci, laquelle a pris le nom de Gargano, (**Beniston, 1984**). Elle est également connue sous le nom Bou-Néfa, Derias en Arabe et Adhéries en Kabyle.

IV. 4.2. Description :

Thapsia garganica L est une Ombellifère vivace et herbacée **(Crété, 1965)**.

Composée des parties :

Les feuilles

Les feuilles de *Thapsia garganica* sont longues, elles sont pétiolées, dilatées inférieurement en une gaine concave, a limbe bi ou tripennatiséqué, lisses en dessus, linéaires, étroites, allongées, aiguës **(Soubeiran, 1840)**.

La racine :

Grosse racines cylindrique marquée de stries annulaires entourée de poils a la base. Remplie d'un suc laiteux. **((R.R Paris et al, 1981)**.

Les Tige



Sa tige est forte, droite, légèrement striées, haute d'un pied et plus, elle se divise en rameaux, étalés garni de feuilles pétiolées **(Souberain, 1840)**.

Les Fleurs



D'une jaune pale, forment plusieurs ombelles composées de huit à douze rayons. **(Soudeiran, 1840)**.

Le fruit :



Fruits à coté marginales développés **(R.R Paris et al, 1981)**.

IV. 4.3. Classification :

La systématique botanique permet de classer *Thapsia garganica* L parmi les systèmes du règne végétal en se référant à la classification de **Gomez (2007)**.

Division: Angiospermes

Classe: Dicotylédones

Sous classe: Archichlamideae

Ordre : Umbeliforales

Famille : Umbelifereae

Genre : Thapsia

Espèce : *Thapsia garganica* L

IV. 4.4. Cueillette de la plante :

Les plantes étudiées ont été récoltées le 25-03-2013 de deux régions : ADEKAR à BEJAÏA et au piement du mont CHREAA à BLIDA. La description de ces deux régions est donnée dans ce qui suit :

Blida : est situé à 40 km au sud de la capitale Alger, à environ 20 km des côtes du Sahel algérois. Limité par les wilayas de Tipaza et Alger au nord, Ain Defla à l'ouest, Médéa au sud, Boumerdes et Bouira à l'est. Le relief de la wilaya de Blida se compose de la plaine de la Mitidja (53 %), de piedmonts de 200 à 600 m d'altitude (23 %) et de relief montagneux (24 %).

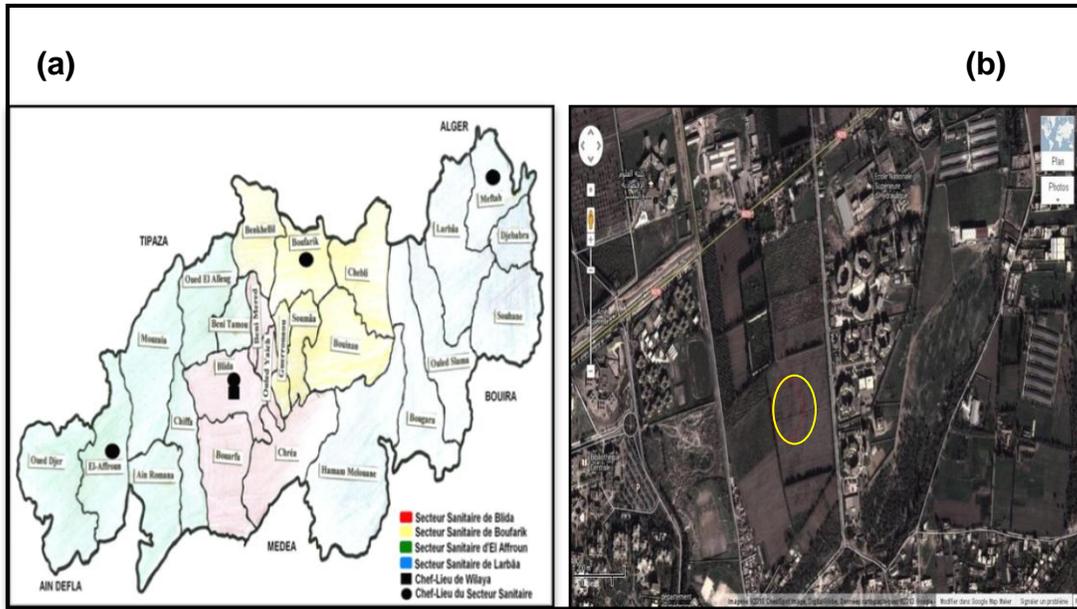


Figure25 : Carte géographique de la wilaya de Blida en (a) et carte géographique de la région de Somaia en (b).

Bejaia : La Wilaya de Béjaia est située au nord-est de l’Algérie. Elle est limitée à l’est par la wilaya de Jijel, à l’ouest par Tizi-Ouzou et Bouira, au sud par les wilayates de Sétif et Bordj Bou Arreridj et au nord par la mer méditerranéenne sur une longueur de 95 Km.

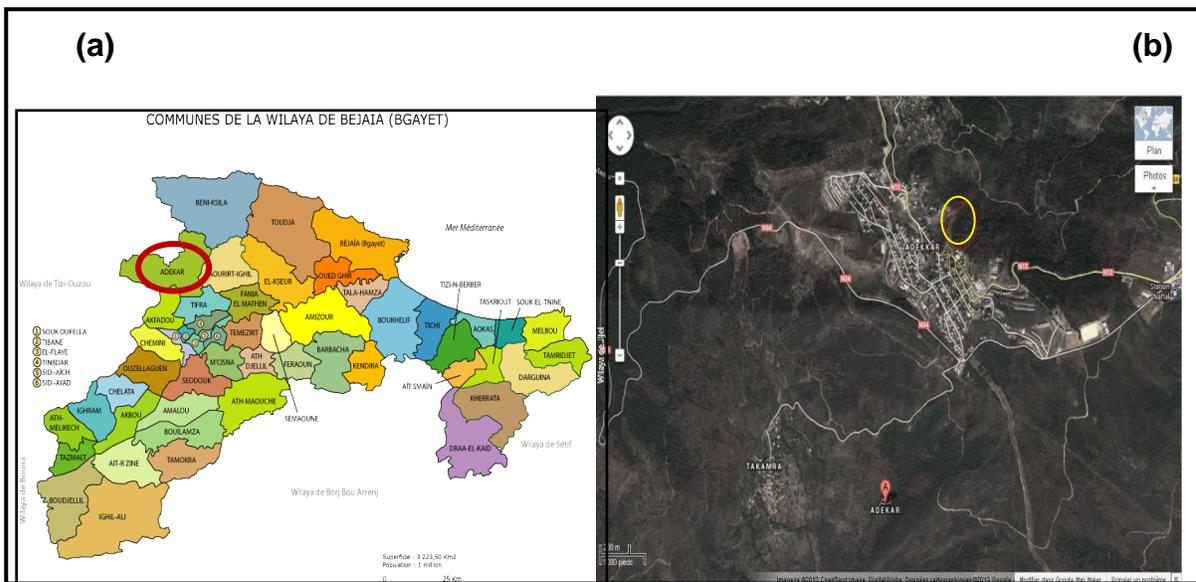


Figure 26 : carte géographique de la région de Bejaia en (a) et carte géographique de la région d’Adekar en (b).

IV. 4.5. Séchage, broyage et tamisage :

Les racines et les feuilles des *Thapsia garganica* ont été séchées à l'ombre et à température ambiante pendant 15 jours ; les racines ont été d'abord découpées en petites rondelles dans le but d'accélérer le séchage. Puis les deux parties ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre fine qui sera tamisés.

IV. 5. Extraction d'huile essentielle de « *Thapsia garganica* L »

L'extraction des huiles essentielles des feuilles et des racines des deux régions Blida et Bejaïa ont été réalisé par hydrodistillation (type Clevenger). Le principe de cette méthode, préconisée par la pharmacopée Européenne, est basé sur un entrainement des constituants volatiles de l'huile essentielle par la vapeur d'eau. Cette dernière chargée des produits volatils est condensée dans un réfrigérant pour donner de l'huile essentielles après décantation. Le montage utilisé dans notre travail est présenté dans la **figure27**.

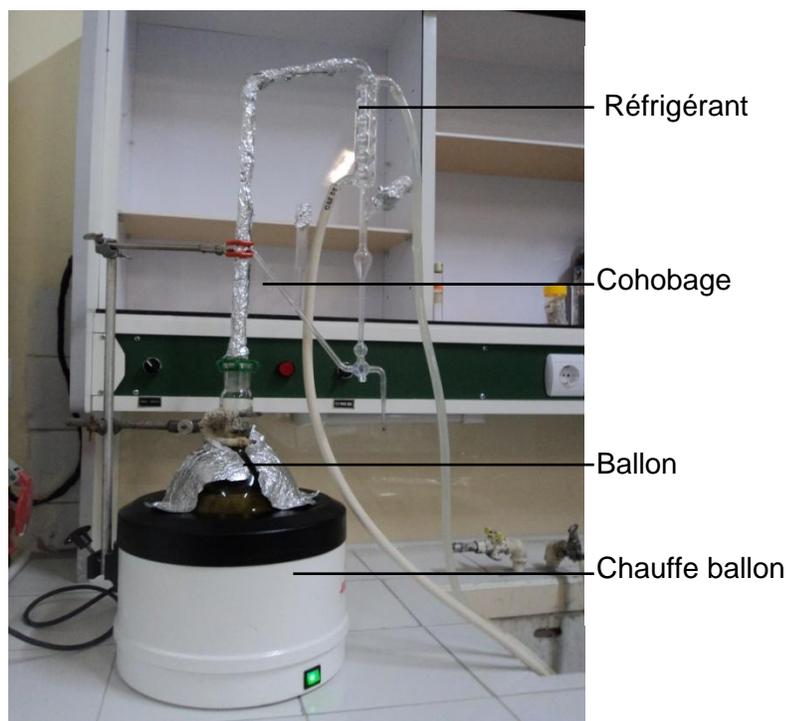


Figure 27: Montage d'hydrodistillation (dispositif Clevenger) – (Original, 2012)

Dans un ballon de 2L, nous avons introduit 100g de matière végétale sec (feuilles, racines), 2/3 de son volume d'eau distillée et quelques grains de pierres ponce. L'ensemble est porté à ébullition pendant 4h après écoulement de la première goutte. La condensation du mélange gazeux, provoque sa séparation en deux phases liquides :

- **La phase organique supérieure** : Appelée huile essentielle contenant la majorité des composés odorants.
- **La phase aqueuse inférieure** : hydrolat ou l'eau aromatique qui contient une quantité non négligeable d'essence sous forme solubilisée. Cette dernière est mise dans une ampoule à décanter à laquelle on ajoute quelque gramme de chlorure de sodium (NaCl), on agite jusqu'à dissolution complète de ce sel. on ajoute le solvant (dichlorométhane), on agite l'ampoule pour obtenir deux phases : la phase aqueuse est située au-dessous car sa densité est plus grande que celle de la phase organique. Après l'extraction, la solution d'huile essentielle dans le solvant peut contenir encore quelque trace d'eau. On les élimine en ajoutant quelque gramme de sulfate de sodium. On filtre et on évapore le dichlorométhane sur l'évaporateur rotatif (température : 40-45°C) pour récupérer l'huile essentielle.

IV. 5.1. Rendement de l'huile essentielle :

Dans notre cas ; on définit le rendement en huile essentielle par le rapport entre la masse d'huile essentielle (M_{HE}) et la matière végétale sèche (M_{VS}), il est exprimé en % et donné par la relation ci-dessous :

$$R_{dt_{HE}} = \frac{M_{HE}}{M_{VS}} \times 100$$

Avec :

R_{dt} (%) : Rendement en huile essentielle ;

M_{HE} : Masse de l'huile essentielle (g) ;

M_{VS} : Masse de la matière végétale sèche (g).

I.6. Extraction des composés phénoliques (Extraction par soxhlet) :

L'extraction au soxhlet figure 28 a été retenue comme technique d'extraction car elle favorise l'extraction relativement complète des métabolites présents dans la matière végétale.

- A l'intérieur du réservoir entourant le papier filtre, nous avons placé 20 g de matière végétale.
- On a fixé le réservoir au ballon contenant 350mL de méthanol et quelques grains de pierres ponce.
- un réfrigérant est fixé à la partie supérieure du réservoir.

Le solvant est porté à ébullition à l'aide d'un chauffe ballon et passe par la tubulure, il est condensé par le réfrigérant et solubilise les substances à extraire, dès que le niveau du solvant est à hauteur du coude de siphon, le réservoir se vidange automatiquement. Pour l'extraction quasi-totale des substances. Toute cette opération représente un cycle et l'extraction de nos extraits a duré six cycles. Après évaporation totale du solvant (méthanol) par un rotavapeur rotatif à ($T=45^{\circ}\text{C}$), et sous vide une quantité d'eau chaude est additionnée au résidu sec. L'extraction liquide-liquide a été ensuite réalisée avec du chloroforme pour éliminer la chlorophylle et les composés lipidiques. Suivie par une extraction avec le butanol pour récupérer les composés phénoliques. Le butanol est évaporé à sec. La quantité des extraits phénoliques est pesée pour calculer les rendements.

IV. 6. Dosage des phénols totaux :

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide.

Le dosage des phénols totaux a été réalisé par la méthode utilisant le réactif de folin-ciocalteu (Patrice et al, 2003).

IV. 6. 1. Principe :

Le réactif de folin-ciocalteu ou réactif de phénols de folin ou réactif de folindenis, est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$) en milieu basique ; ce

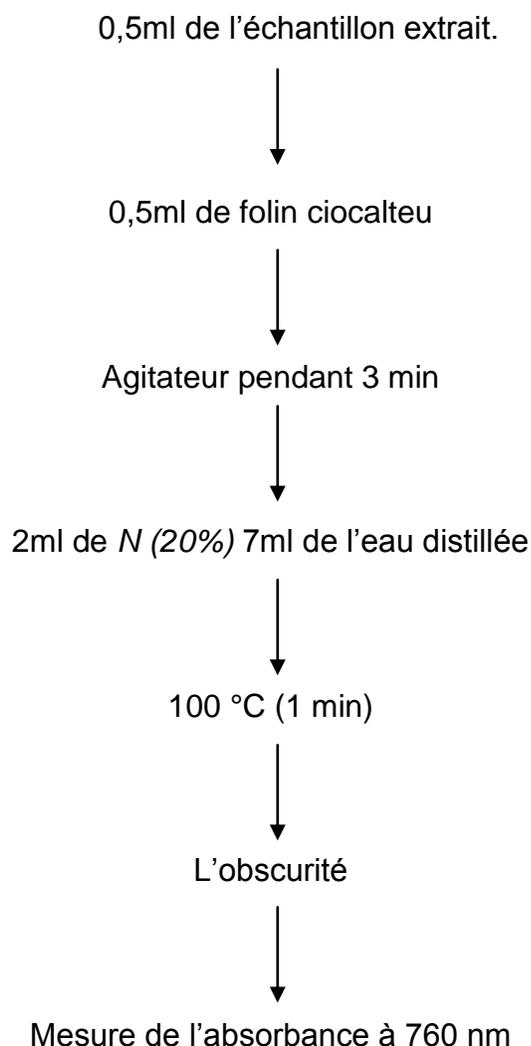
folin ciocalteu fait appel à l'oxydation des phénols présents dans l'échantillon en oxydes correspondants de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène, de couleur bleue, (MO_8O_{23}) dont l'intensité d'absorption est proportionnelle à la quantité de phénols présents dans l'échantillon. Ce dosage est très sensible mais peu spécifique car d'autres composés non aromatiques peuvent également être oxydés. La quantification des phénols totaux a été établie par rapport à une courbe d'étalonnage linéaire ($y = a \alpha + \beta$) réalisé avec l'acide gallique.

IV. 6.2. Mode opératoire :

IV. 6.2.1. Courbe d'étalonnage :

A partir d'une solution mère aqueuse préparée de l'acide gallique de concentration massique 0.5mg/ml. Des solutions filles sont ainsi préparées de concentration allant 0.003mg/ml à 0.013mg/ml. Un volume de 0.5ml de chaque solution filles est introduit dans des tubes à essais, suivi de l'addition de 7ml de l'eau distillé, 0.5ml de réactif Folin ciocalteu (10 fois dilué). 2ml de carbonate de sodium à 20% ont été ajoutés (favoriser le milieu alcalin pour déclencher la réaction d'oxydoréduction). Par la suite ces solutions sont maintenues à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. La lecture de l'absorbance de chaque solution est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 760 nm contre un blanc (eau distillée), ceci nous permis de tracer la courbe d'étalonnage.

L'estimation de la quantité en phénols totaux de notre extrait phénolique (solution mère de 2mg/ml d'eau distillée) est obtenue selon le protocole expérimental cité dans le schéma suivant :



SchémaN°1: protocole de mise en œuvre du test de dosage des phénols totaux.

IV. 7. Etude de pouvoir antioxydant

La mise en évidence du pouvoir antioxydant de nos échantillons est réalisée par 3 tests chimiques chacun de ces tests correspond à un des trois mécanismes de réaction

(RONALD ,2005) qui sont :

- Mécanisme de réaction HAT « transfert d'atome d'hydrogène » réalisé par la méthode de β carotène.
- Mécanisme de réaction SET « simple transfert d'électron » réalisé par la méthode de FRAP « ferricréducing antioxydant ».

- Mécanisme de réaction HAT et SET à la fois réalisé par la méthode de DPPH « 1,1-diphényl-2-picrylhydrazole ».

IV.7.1. Activité de piégeage du radical DPPH :

IV. 7.1.1. Principe :

Le principe de cette méthode est basé sur la mesure du piégeage des radicaux libres de DPPH (Diphénylpicrylhydrazyl) en solution dans l'éthanol. L'addition d'un antioxydant dans une solution de DPPH conduit à une décoloration de ce dernier qui est directement proportionnelle à la capacité antioxydante du produit ajouté. Cette décoloration peut être suivie par spectrophotométrie en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm. Elle fournit donc un moyen pratique de mesurer l'activité antioxydante des huiles essentielles.

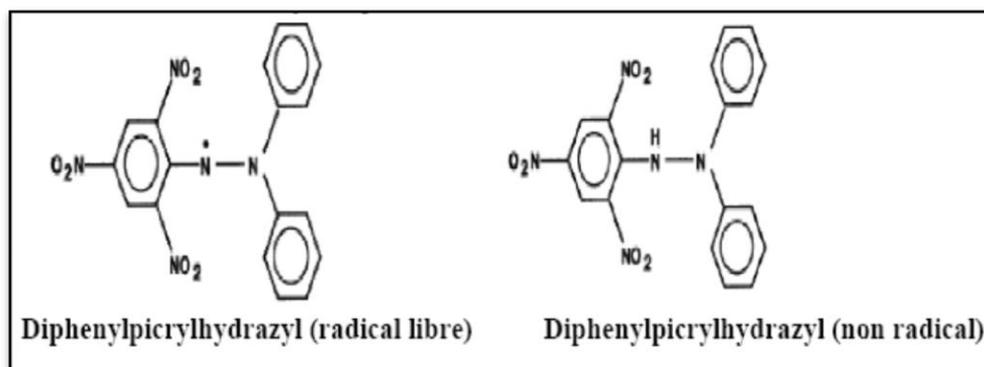


Figure28 : Forme libre et réduite du radical DPPH

Le test de DPPH est réalisé selon la méthode décrite par **(Athanaena, et al. 2010)**.

✓ **préparation de la solution de DPPH :**

La solution de DPPH est préparée en pesant 4 mg de DPPH dans 100ml d'éthanol (96%). Cette solution doit être préparée trois heures à l'avance et doit être mise à l'obscurité et sous agitation pour faciliter la solubilité de la poudre de DPPH.

✓ **Préparation des solutions mères :**

On prépare des solutions mères à raison de 4mg/ml d'éthanol pour les huiles essentielles et d'eau distillé pour les extraits phénoliques.

✓ **Dilution des solutions filles :**

Ces solutions mères, subiront ensuite des dilutions pour avoir différentes concentrations de l'ordre de milligramme par ml comme le résume le tableau suivant.

Tableau3: différentes concentrations des huiles essentielles et des extraits phénoliques utilisées lors du test DPPH.

Echantillons	Huile essentielle	Extrait phénoliques
Concentrations (mg/mL)	0.05	0.01
	0.1	0.02
	0.2	0.05

✓ **L'essai au DPPH :**

Dans les tubes contenant les solutions à tester, on ajoute 1ml de solution de DPPH. Après agitation, les tubes sont placés à l'obscurité, à la température ambiante pendant 30 minutes. Pour chaque concertation, le test est répété trois fois.

La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517nm par un spectrophotomètre.

Pour chaque dilution, on prépare :

- un contrôle négatif composé de 1ml de la solution de DPPH et 1ml d'éthanol.
- un contrôle positif représenté par une solution d'un antioxydant standard l'acide ascorbique, BHA(Butylhydroxyanisol) et BHT (Butylhydroxytoluène) dont l'absorbance est mesuré dans les mêmes conditions que l'échantillon test.

IV. 7.1.2. Expression des résultats :

Le pouvoir antioxydant des huiles essentielles et des extraits phénoliques exprime la capacité à piéger le radical libre est évalué par le pourcentage d'inhibition (I %) qui est donné par la formule suivante (**Laid, 2012**).

$$I\% = (\text{abc}_{\text{controle}} - \text{abc}_{\text{échantillon}}) / \text{abc}_{\text{controle}} \times 100$$

I% : pourcentage d'inhibition

Abs : absorbance à la longueur d'onde 517nm.

IV. 7.2. Test de blanchissement du β - carotène :

IV. 7.2.1. Principe :

Elle consiste à mesurer, à 470 nm, la décoloration du β -carotène résultant de son oxydation par les produits de décomposition de l'acide linoléique. L'addition d'antioxydants purs ou sous forme d'extraits végétaux induit un retard de la cinétique de décoloration du β -carotène (**Bourkhiss 2010**).

✓ **préparation de la solution de β - carotène :**

0.5 mg de β - carotène ont été dissous dans 1 ml de chloroforme. La solution obtenue a été introduite dans un ballon contenant 2 mg d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40. Après évaporation du chloroforme, 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène ont été ajoutés avec agitation vigoureuse.

Les concentrations des solutions mères et filles des huiles et des extraits phénoliques utilisés dans ce test sont les mêmes que celle de l'activité de piégeage du radical DPPH.

✓ **L'essai au β - carotène :**

Dans les tubes contenant 350 μ l des solutions filles de chaque huile essentielle et extrait phénoliques à tester. On a ajouté 2.5 ml de solution de β - carotène.

Un contrôle positif représenté par une solution d'un antioxydant standard BHT (Butylhydroxytoluène) dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que l'échantillon test.

L'absorbance a été immédiatement mesurée à 490 nm. D'autres lectures sont mesurées à différents intervalles de temps (0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 24h et 48h).

L'activité antioxydante relative après 48 heures est calculée selon la relation suivante :

$$\text{AAR} = (\text{Abs Échantillon} / \text{Abs BHT}) \times 100$$

Où :

AAR : activité antioxydante relative ;

Abs échantillon: absorbance de l'échantillon après 48 heures ;

Abs BHT : absorbance du BHT après 48 heures.

IV. 7.3. Test de la réduction du fer (FRAP) :

IV. 7.3.1. Principe :

Ce test est simple, rapide et reproductible. Il est universel peut être appliquée aussi bien chez les plates que chez les plasmas.

La présence des réducteurs dans les extraits et les huiles essentielles des plantes provoque la réduction de Fe^{3+} / complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent, Fe^{2+} peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700 nm (**Bougandora et al. , 2012**).

IV. 7.3.2. Mode opératoire :

Le pouvoir réducteur du fer (Fe^{3+}) en (Fe^{2+}) dans l'huile essentielle et l'extrait est déterminé selon la méthode décrite par (**Oyaizu,1986**) :

0.5ml d'huile essentielle a concentration (4mg /ml) est mélangé avec 1.25ml d'une solution tampon phosphate 0.2M (pH 6.6) et 1.25ml d'une solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ a1%.L'ensemble est incubé au bain marie a 50°C pendant 20min ensuite, 1.25ml d'acide trichloroacétique a 10% sont ajoutés et les tubes sont centrifugés a 800 tours/min pendant 10 min.

Enfin, 1.25 ml du surnageant ont été mélangés avec 1.25ml d'eau distillée et 0.25ml de chlorure ferrique (Fe cl_3) de 0.1%.

La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700nm contre un blanc semblable préparé, en remplaçant l'huile essentielle par l'éthanol.

Le contrôle positif est représenté par des solutions des antioxydants standards, acide ascorbique, BHT, BHA dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons.

Le même protocole a été utilisé pour l'extrait phénolique à concentration (4mg/ml).

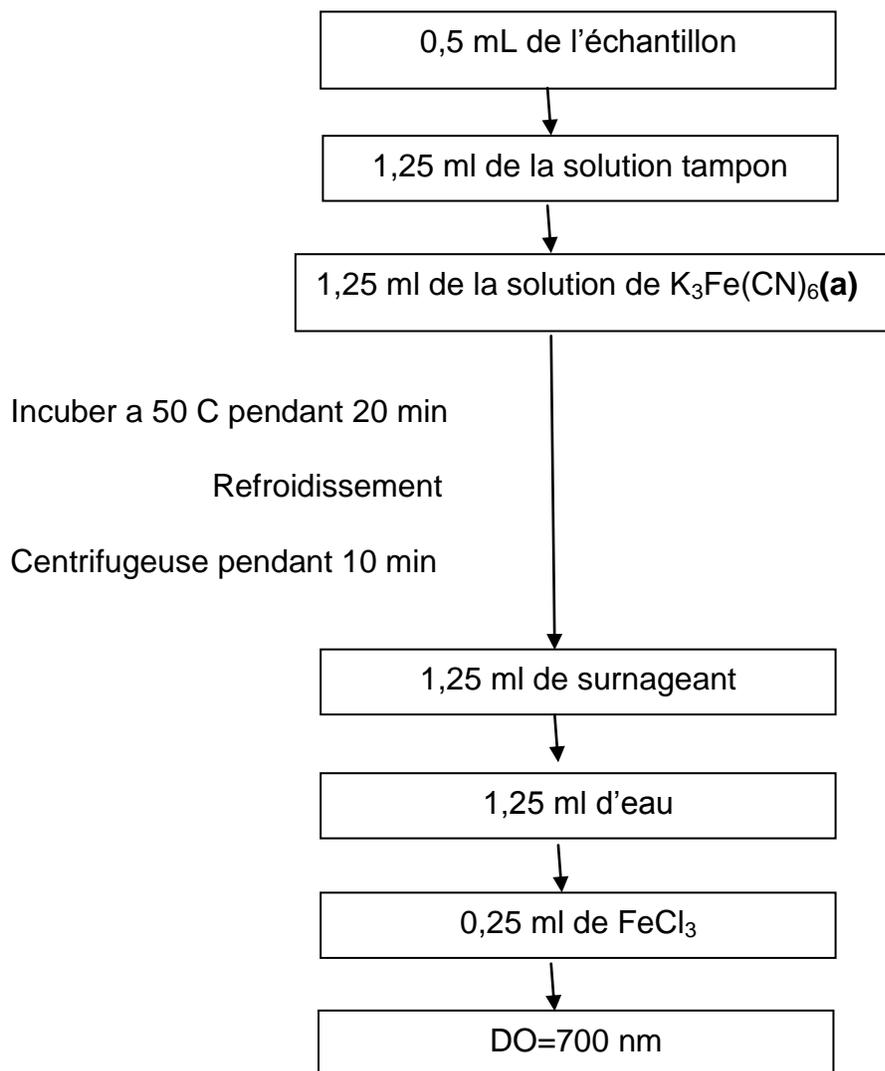


Schéma N°2 : Protocole de mise en œuvre du test d'activité antioxydante par la méthode FRAP.

IV. 8. Evaluation de l'activité antimicrobienne :

Pour évaluer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits phénoliques de *Thapsia garganica* des deux régions, nous avons adoptés la méthode de CMI (concentration minimale inhibitrice) et la méthode de diffusion sur milieu gélosé en utilisant des disques stériles en celluloses : appelée aromatoigramme, Les tests ont été réalisés au laboratoire d'hygiène et de contrôle alimentaire de la wilaya de Blida.

IV. 8.1. Aromatogramme :

IV. 8.1.1. Principe :

Cette méthode inspirée de l'antibiogramme qui permet de déterminer l'activité inhibitrice de croissance de l'huile essentielle et d'extrait (**Debillerbeck, 2007**). Le principe de la méthode repose sur la diffusion de composé antimicrobien en milieu solide dans une boîte de pétri, avec création d'un gradient de concentration après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition. La souche sera qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante (**Benjelali et al., 1986**).

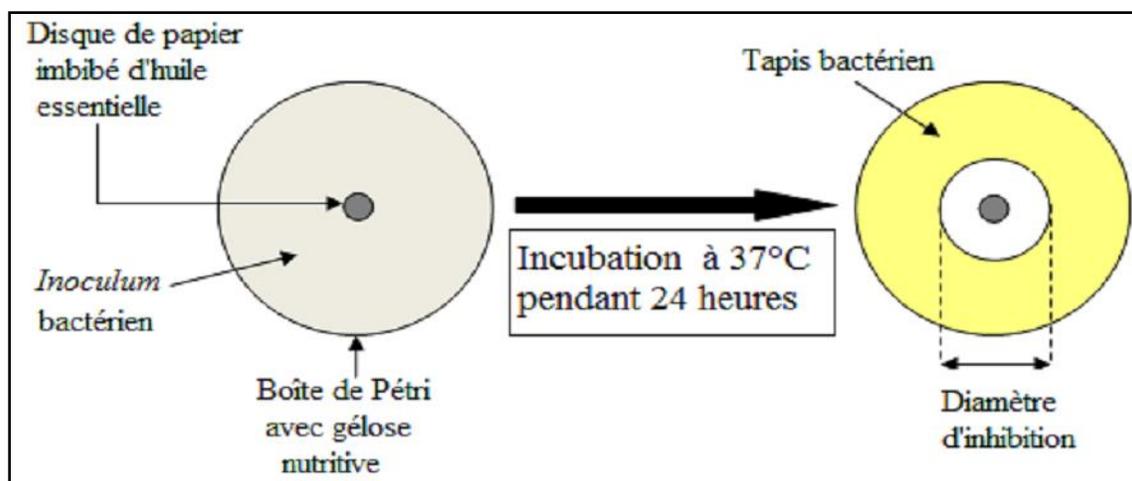
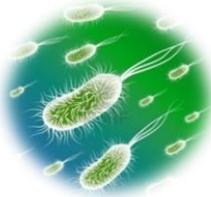


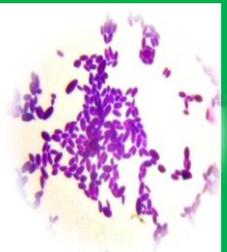
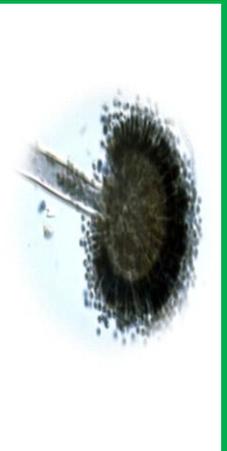
Figure 29 : Illustration de la méthode d'Aromatogramme sur boîte Pétri (**Akkache et al. , 2012**).

IV. 8.1.2. Souches microbiennes choisies :

Dans le but d'évaluer le pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle et d'extrait, sept souches microbiennes ont été testées (3 bactéries, 2 champignons et 2 levures). Les Souches bactériennes utilisées proviennent de l'hôpital de Boufarik et les champignons et les levures sont issues de la collection du laboratoire de recherche sur les produits bioactifs et la valorisation de la biomasse de l'ENS de Kouba. Ces derniers sont choisis pour leur fréquence élevée à contaminer les denrées alimentaires et pour leur pathogénicité.

Le tableau N° 4: illustre les caractéristiques, et les principales pathologies des souches microbiennes testées :

	Nom de la souche	N° ATCC	Pathologie	Allure
Bactérie à Gram négatif	E. coli	25422	Pathogène : Infection intestinale, infections urinaires méningites	
	Salmonella		Pathogène : la fièvre typhoïde et paratyphoïde et la toxi- infection alimentaire et les gastr -entirites	
	Pseudomonas aerogénosa	3547	Pathogène : Flore de transit sur la peau et les muqueuses et cause des surinfections de plaies ou brûlures.	

Levures	Candida albicans		Pathogènes : Infections fongiques essentiellement au niveau des muqueuses digestives et gynécologiques.	
	Candida Tropicalis			
Champignons	Aspergillus nigers		Pathogène : engendrer une otite externe invasive dont les conséquences peuvent aller de la perte définitive de l'audition au décès du patient	
	Penicillium sp		Responsables de nombreuses dégradations alimentaires.	

• **Préparation de l'inoculum :**

Pour chaque germe on prépare une suspension à une turbidité de 0.5 M.C Farland à l'aide d'un densitomètre MC. Farland.

IV. 8.1.3. protocole expérimentale :✓ **Ensemencement des boîtes pétri :**

Couler aseptiquement les milieux de culture gélosés : Muller Hinton pour les bactéries et le Sabouraud pour les champignons, dans des boîtes de pétri à raison de 10ml par boîte .on laisse refroidir et solidifier sur la paillasse.

On ensemence la surface de milieu de culture en striant l'écouvillon trois fois sur la surface de milieu de culture, en entourant la boîte pétri à chaque fois d'environ 60 degrés pour assurer une répartition uniforme de l'inoculum.

✓ **Echantillon a testée :**

Afin d'étudier le pouvoir antimicrobien de nôtres échantillons, on a préparé une solution mère de 4ml méthanol et 50mg d'huile essentielle et d'extrait phénolique pour chaque échantillon.

✓ **Dépôt de disque :**

On utilisant une pince stérile, placer des disques de 9mm de diamètres sur la surface de milieu de culture .à l'aide d'une micropipette, des quantités de (30,70 μ L) de l'huile essentielle et d'extrait sont disposées sur les disques .les boîtes pétri ont été soumise à une température de 4°C pendant 4 heures suivi d'une incubation à 35°C pendant 24 heures et 48 heures pour les bactéries et les champignons respectivement.

✓ **Lecture :**

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'un pied de coulisse ou une règle en (mm). Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition (**Ponce et al., 2003**).

IV. 8.2. La concentration minimale inhibitrice(CMI) :

La détermination de la concentration minimale inhibitrice(CMI) est réalisée par la méthode de dilution en milieu gélosé.

Des dilutions ont été effectuées dans une gamme de concentration de 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 300 μ Là partir d'une solution mère de 60mg/mL de méthanol pour les huiles essentielles et de l'eau distillé pour les extraits phénoliques.

1mL de Tween 80 est ajouté à 200mL de Muller Hinton liquéfié à 95°C. Mélanger chaque dilution de l'huile essentielle et d'extrait phénolique à tester avec 5 mL de gélose MH, puis agiter manuellement les tubes.

Transverser chaque contenu des tubes dans des boîtes pétri. Après solidification du milieu, réaliser un ensemencement en surface de suspension bactérienne de concentration de 10^6 UFC/ML. L'ensemble est incubé à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et levures et pendant 48 heures pour les champignons.

V. 1. Extraction des huiles essentielles de « *Thapsia garganica L* » :

L'extraction de l'huile essentielle de « *Thapsia garganica L* » provenant des deux régions (Blida et Bejaia) réalisée par la méthode d'hydrodistillation (type *Clevenger*) a donné des rendements répartis dans le tableau n° 5 et la figure 30 qui sont exprimés en g / 100g de matière sèche.

Tableau n°5 : Rendement en huile essentielle de l'espèce étudiée (g/100g de matière végétale).

Régions	Rendement(%)	
	Feuilles	Racines
Blida	0.062	0.078
Bejaia	0.293	0.107

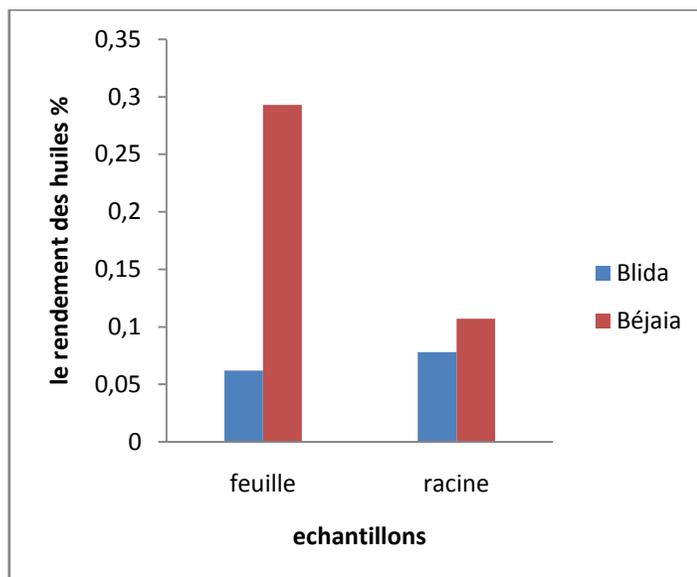


Figure 28 : Histogramme des rendements des huiles essentielles de « *Thapsia garganica L* » de Blida et de Bejaia.

L'extraction de l'huile essentielle de la partie aérienne (feuilles et tiges) et de la partie souterrains (racines) de l'espèce « *Thapsia garganica L* » donne des faibles rendements pour les deux régions étudiées.

On remarque que les rendements en huiles essentielles des plantes des deux régions est très différent. Concernant les feuilles on passe de 0.062% à 0.293%, quand au racines de 0.078% à 0.107% respectivement pour la plante de Blida et celle de Bejaia.

D'autres parts on remarque que la différence des rendements entre les racines et les feuilles varie selon la région. Alors que le rendement des racines est très proche de celui des feuilles chez la plante de Blida il est respectivement de 0.078% et de 0.062%, celui des racines de la plante de Bejaia est presque le tiers de celui ses feuilles, soit 0.107% et 0.293%. Cela est du a l'état végétatif des deux plantes.

À titre de comparaison, le tableau n°7 donne des différents rendements obtenus à partir d'autres échantillons de « *Thapsia garganica L* » provenant des différentes régions .

Tableau n°6 : Comparaison des différents rendements en huile essentielle de l'espèce étudiée des régions différentes.

Région	Rendements(%)		Référence
	Feuilles	Racines	
Kharrata (Bejaia)	0.09	0.06	Ladjel et al ,2011
Khenchela	0.29	0.22	Akkache et al, 2012

Cela est dû à la nature du sol, des conditions climatiques, de la position géographique de la région, les technologies agricoles, telles que le stade végétatif (floraison, état végétatif), ainsi que l'application des différentes techniques d'extractions, l'état de la matière végétale.

V. 2. Caractéristiques physiques et organoleptique des huiles essentielles de « *Thapsia garganica L* » des deux régions :

Tableau n° 7 : Les caractéristiques physiques et organoleptique des huiles essentielles de « *Thapsia garganica L* » des deux régions

Région	Aspect
- Blida	- Liquide mobile visqueux - Couleur bleu roi - Faible odeur désagréable
- Bejaia	- Liquide mobile visqueux - Couleur bleu roi - Forte odeur désagréable

V. 3. Dosage des phénols totaux :

Le calcul de la concentration en phénols totaux de l'extrait phénolique de « *Thapsia garganica L* » se fait à partir de la valeur moyenne des absorbances obtenues à une longueur d'onde de 760nm, en utilisant la courbe d'étalonnage illustrée dans la figure29

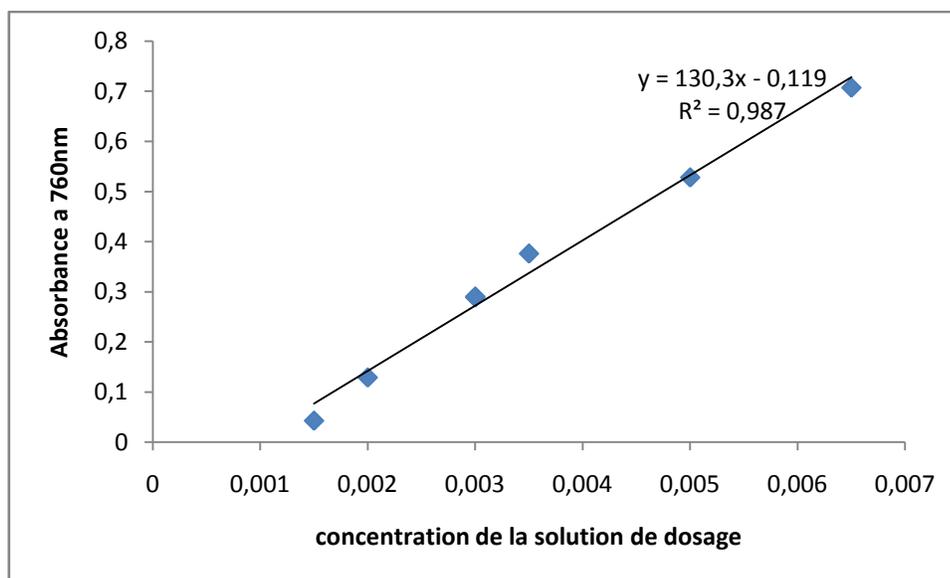


Figure 29 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.

La teneur en phénols totaux de l'extrait phénolique de « *Thapsia garganica L* » pour les deux régions est reportée dans le tableau n°8 la figure 30 ci-dessous :

Tableau n°8 : La teneur en phénols totaux de l'extrait de « *Thapsia garganica L* » des deux régions :

Région	Teneur en phénols totaux (mgEAG/g d'extrait sec)	
	Feuille	Racine
Blida	26,29	18,79
Bejaia	29,40	20,21

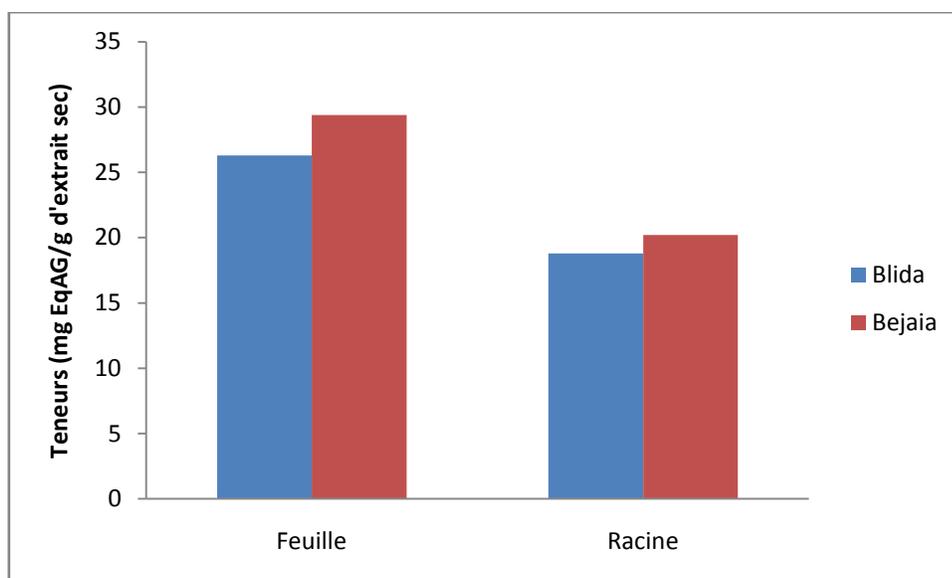


Figure 30 : Histogramme des teneurs en phénols totaux des extraits de *Thapsia garganica* des deux régions étudiées.

Les résultats représentés au tableau n°8 et figure 30 montrent que la teneur en phénols totaux des racines par rapport à celle des feuilles de *Thapsia garganica L* des deux régions est significativement déférente. Elle est plus importante dans les feuilles que dans les racines. Ceci s'explique par la présence de ces composants beaucoup plus dans les cellules photosynthétiques (**Akkache et al., 2012**).

La teneur en phénols totaux de *Thapsia garganica L* de Bejaia qui est de 26.29 mg EAG/g d'extrait sec pour les feuilles et 18.79 mg EAG/g d'extrait sec pour les racines

est plus importante que celle de Blida qui n'est que de 29.40 mg EAG/g d'extrait sec pour les feuilles et 20.21 mg EAG/g d'extrait sec pour les racines.

Les conditions climatiques, la position géographique de la région et la nature de sol peuvent être considérés comme facteurs influençant sur les différentes variations des teneurs en phénols totaux de *Thapsia garganica L* des deux régions.

V. 4. Etude de pouvoir antioxydant des huiles essentielles et des extraits phénolique :

L'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits phénoliques de « *Thapsia garganica L* » des deux régions a été évaluée de trois manières différentes : le test au DPPH, la technique de décoloration du β -carotène et la mesure du pouvoir réducteur (FRAP).

V. 4.1. Activité de piégeage du radical DPPH :

L'estimation du pouvoir antioxydant de nos échantillons a été réalisée en utilisant la méthode spectrophotométrique en suivant la réduction du radical DPPH avec le changement de sa couleur violette à la couleur jaune par la mesure des absorbances à une longueur d'onde de 517nm.

- **Activité de piégeage du radical DPPH des huiles essentielles :**

La capacité des huiles essentielles d'agir en tant que donneur d'atomes d'hydrogène ou d'électrons dans la transformation de DPPH dans sa forme réduite, DPPH-H a été calculée et représentée au tableau n°9 et à la figure 31 .

Tableau 9 : la capacité antiradicalaire des l'huiles essentielles de *Thapsia garganica L*

Concentrations mg/ml	régions	Pourcentage d'inhibition (%)				
		Feuilles	Racines	BHT	BHA	Vit C
C1 (0,05)	Blida	1,06	11,55	55,06	80,14	96,76
	Bejaia	2,72	12,17			
C2 (0,1)	Blida	2,74	14,77	66,55	90,86	97,99
	Bejaia	5,23	17,89			
C3 (0,2)	Blida	4,35	27,49	92,97	96,84	98,47
	Bejaia	6,42	30,86			

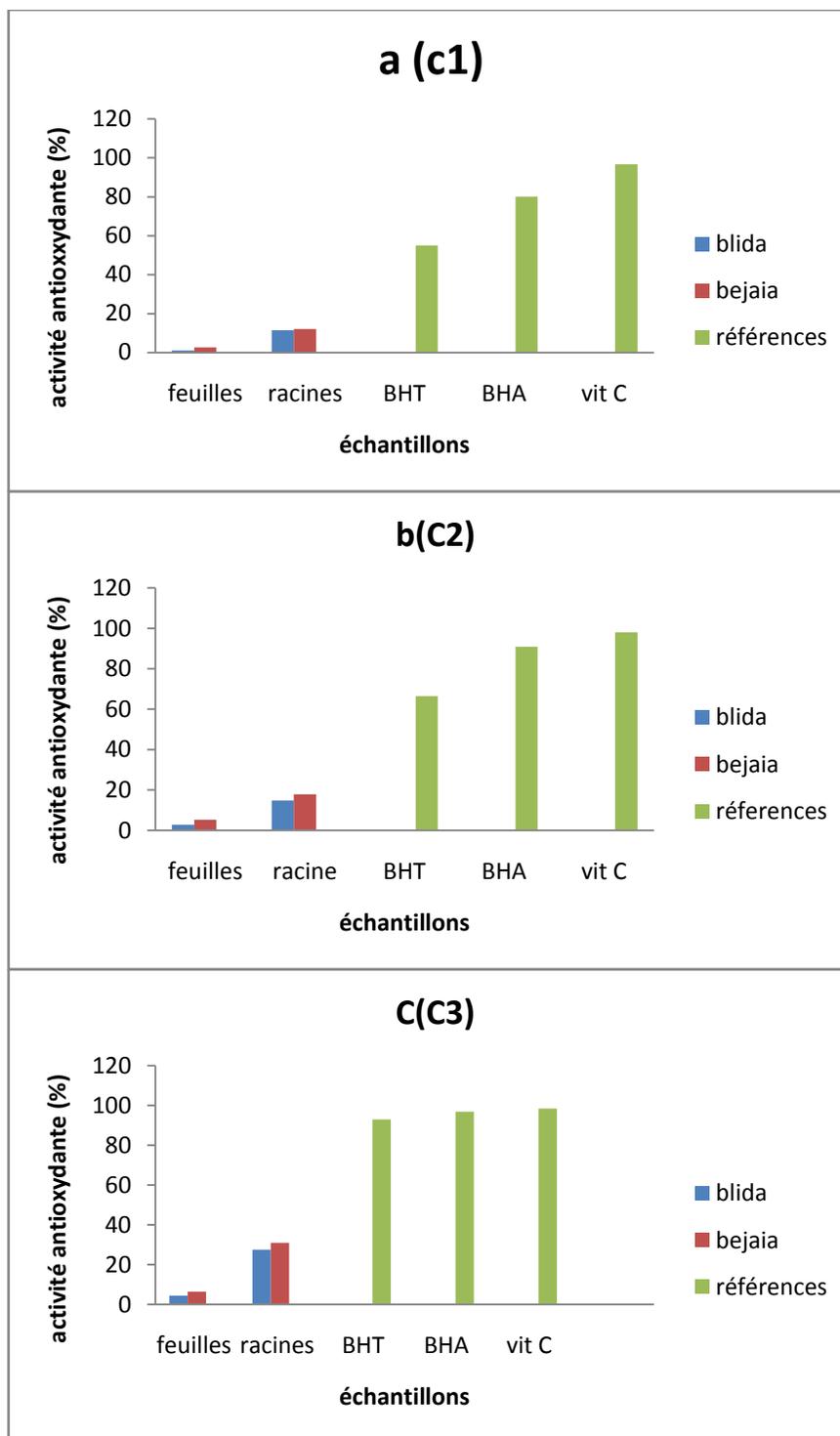


Figure 31 : Histogramme de la capacité antiradicalaire des l'huiles essentielles de *Thapsia garganica* L des deux régions.

L'analyse des résultats présentés au tableau n°9 et la figure 31 ci-dessus citée montre que :

L'augmentation de la concentration de l'huile essentielle entraîne l'augmentation de l'activité antioxydante par le piégeage du radical DPPH, cela s'interprète largement en passant de l'histogramme a(C1), b(C2), c(C3). Si on prend l'exemple des huiles essentielles des racines de Bejaia on remarque que l'activité passe de 11,5%, 14,77% à 27,49% en passant de C1 (0.05mg/ml), C2 (0.1mg/ml) à C3 (0.2mg/ml).

D'autre part, on remarque que quelque soit la concentration des échantillons testés, l'activité des antioxydants de synthèse (BHA, BHT et vit C) est nettement supérieure à celle de l'huile essentielle de la plante de Bejaia ainsi que celle de Blida. Et que l'activité de BHT est inférieure à celle de BHA qui est inférieure à celle de la vit C, cela est en parfaite concordance avec la bibliographie.

L'activité de l'huile essentielle des racines des deux plantes est supérieure à celle de leurs feuilles. A titre d'exemple elle est de 27,49% dans les racines et de 4,35% dans les feuilles à concentration 0.2mg/ml pour la plante de Blida. Et l'activité des feuilles et des racines de la plante de Bejaia est supérieure à celle de la plante de Blida. La différence d'activité entre les différentes parties de la même plante d'une part et entre les plantes des deux régions d'autre part peut s'expliquer par l'analyse chimique des huiles essentielles CG-MS.

- **Activité de piégeage du radical DPPH des extraits phénoliques :**

La capacité des extraits phénoliques des deux plantes de *Thapsia garganica* de piéger le radical DPPH est calculée et représentée au tableau n°10 et à la figure 34

Tableau n°10 : la capacité antiradicalaire des extraits phénoliques de *Thapsia garganica L* des deux régions :

Concentrations	régions	Pourcentage d'inhibition (%)				
		Feuilles	Racines	BHT	BHA	Vit C
C1(0,01)	Blida	49,69	10,14	55,07	80,14	96,76
	Bejaia	57,45	18,88			
C2(0,02)	Blida	65,25	23,09	66,5	90,86	97,99
	Bejaia	72,55	38,85			
C3(0,05)	Blida	80,07	37,66	92,97	96,84	98,47
	Bejaia	81,61	53,01			

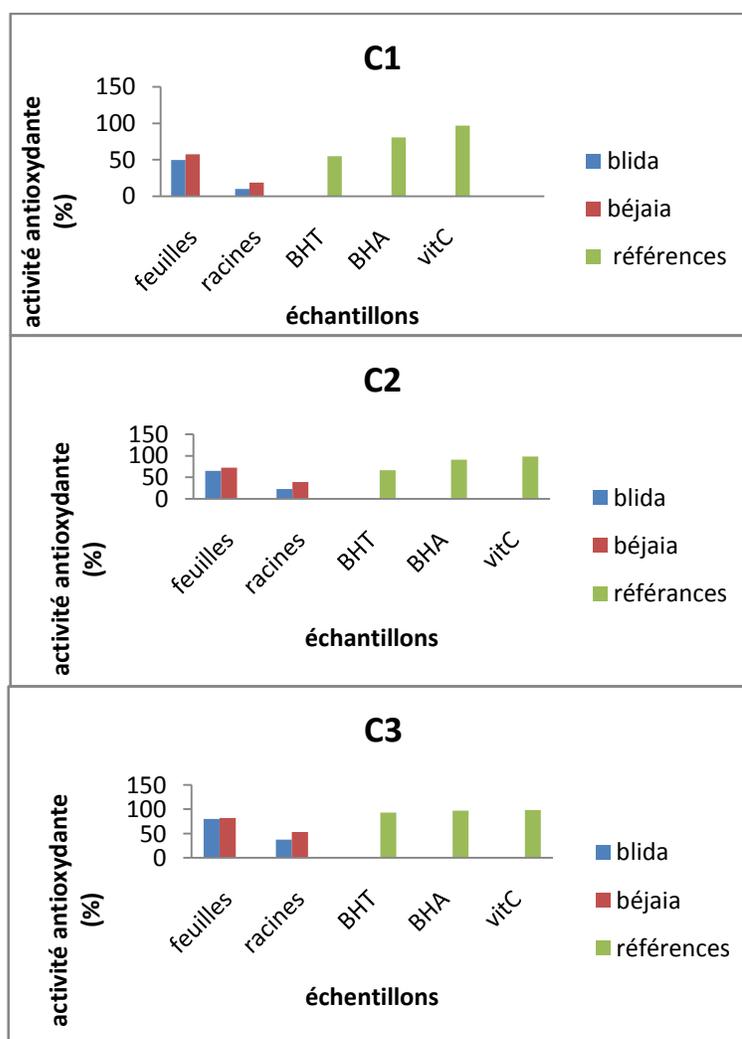


Figure32 : Histogramme de la capacité antiradicalaire des extraits phénoliques de *Thapsia garganica L* des deux régions.

Les résultats mentionnés au tableau n° 10 et à la figure 32 montrent que l'activité antiradicalaire des feuilles des deux plantes est supérieure à celle de leurs racines. A titre d'exemple, elle est de 80,07% pour les feuilles et de 37,66% pour les racines à concentration 0,05mg/ml pour la plante de Blida. L'activité antiradicalaire des feuilles et des racines de la plante de Bejaia est supérieure à celle de Blida.

En comparant l'activité antiradicalaire des huiles essentielles à celle des extraits phénoliques, il ressort que l'activité des huiles essentielles et des extraits phénoliques de la plante de Bejaia est supérieure à celle de la plante de Blida.

L'activité des extraits phénoliques des deux plantes est supérieure à l'activité de leur huiles essentielles malgré que les extraits sont à concentration plus faible que celle des huiles essentielles, cette différence significatif est probablement dû à la présence des principes actifs responsables de cet activité, ainsi qu'une bonne séparation de l'extrait peut-être la raison pour laquelle on a obtenus cet importante action radicalaire.

V. 4.2. Test de blanchissement du β -carotène

Dans ce test, l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes, suite à l'abstraction des atomes d'hydrogène à partir de groupements méthylènes diallyliques de l'acide linoléique (**Himde, 2010**). Ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β -carotène hautement insaturé entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie spectrophotométriquement à 490 nm. Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du β -carotène.

- **Activité antioxydante des huiles essentielles :**

La cinétique de blanchissement du β -carotène en absence et en présence des huiles essentielles et du BHT et les pouvoirs d'inhibition relatifs sont respectivement représentés dans la figure33 et 35.

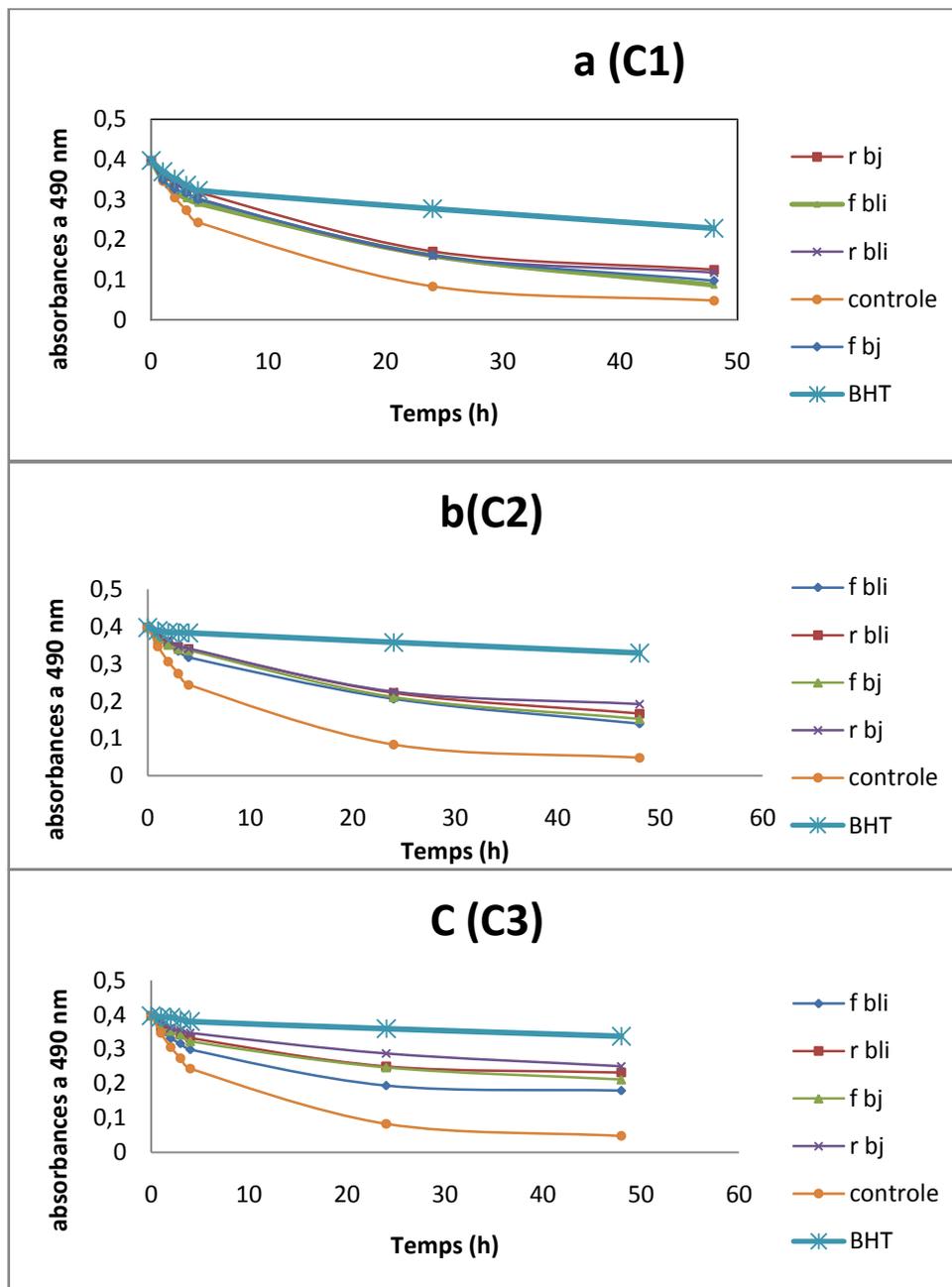


Figure33 : Cinétique de blanchissement du β -carotène à 490 nm en absence et en présence des antioxydants (huiles essentielles et BHT).

La comparaison de la variation de l'absorbance de β carotène en présence des antioxydants (huile essentielle et BHT) à différents intervalles de temps montre

l'efficacité de ces derniers à inhiber le blanchissement de β carotène. Alors que en absence d'antioxydants. L'absorbance passe de 0,3973nm à 0,048nm de T_0 à 48h respectivement. Cette absorbance n'augmente qu'en présence d'huile essentielle.

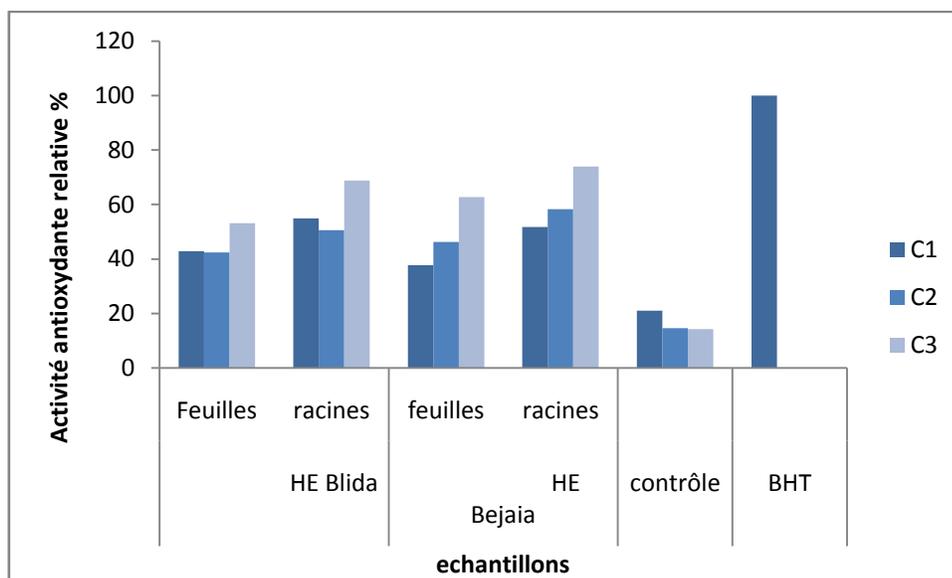


Figure34 : Histogramme de l'activité antioxydante relative des huiles essentielles des deux plantes.

La cinétique d'inhibition d'oxydation de β carotène par les huiles essentielles montre l'ordre suivant de la puissance antioxydant : le BHA suivi par l'huile essentielle des racines de la plante de Bejaia avec un pourcentage d'inhibition de (74%) à 48 h pour C3, puis par les racines de la plante de Blida (68,81), après les feuilles de Bejaia (62,71%) et en fin les feuilles de Blida avec un pourcentage de (53,21%).

D'après ces résultats, on remarque que l'activité relative des huiles essentielles des racines de *Thapsia garganica* L des deux régions, est plus importante que celles des feuilles.

- **Activité antioxydante des extraits phénoliques :**

La cinétique de blanchissement du β -carotène en absence et en présence des extraits phénoliques et du BHT et les pouvoirs d'inhibition relatifs sont respectivement représentés dans la 33 et 34.

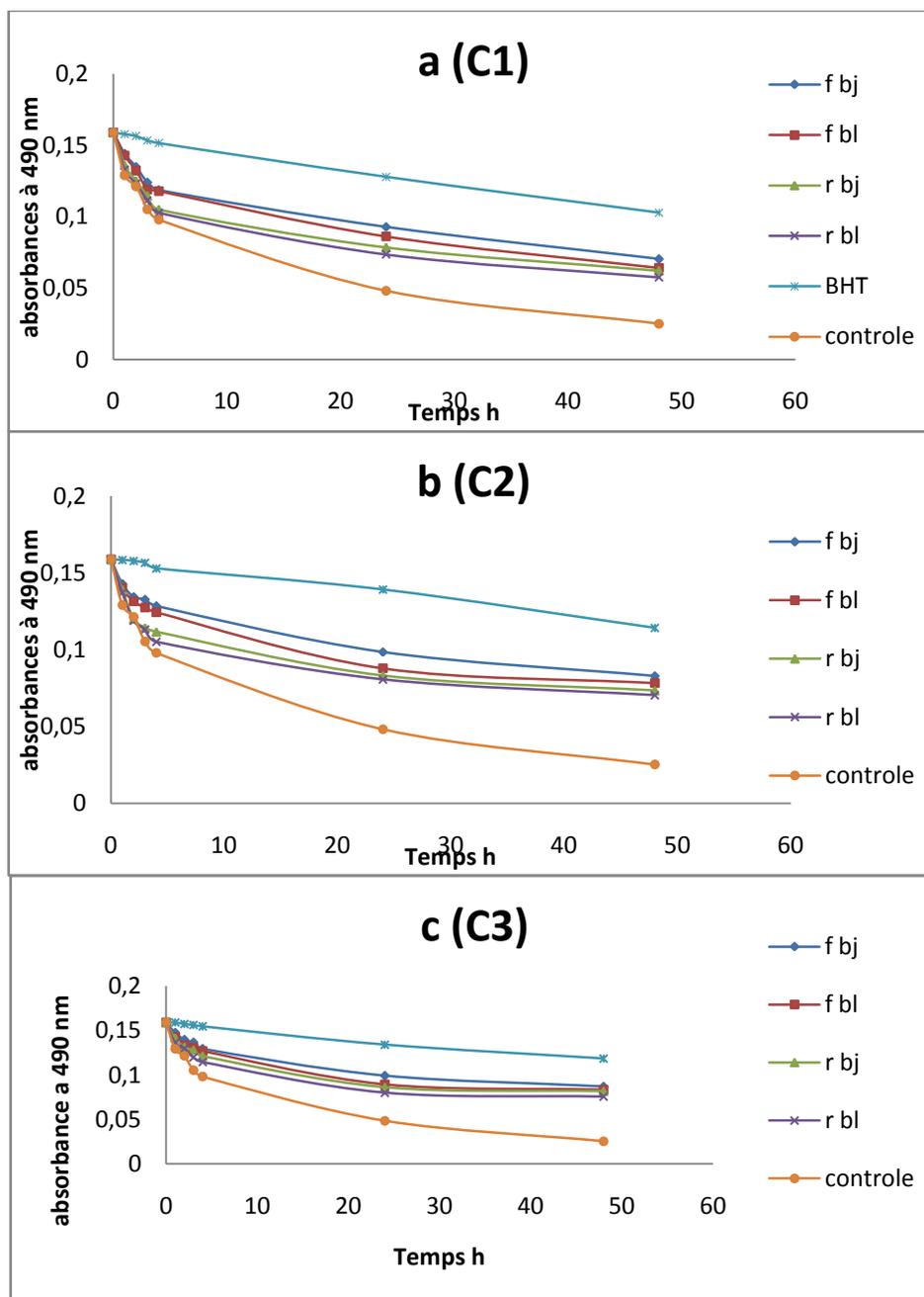


Figure 35 : Cinétique de blanchissement du β -carotène à 490 nm en absence et en présence des antioxydants (extrait phénolique et BHT).

D'après ces résultats, il est évident que le standard et les extraits phénoliques testés inhibent d'une manière efficace l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β carotène par rapport au contrôle négatif.

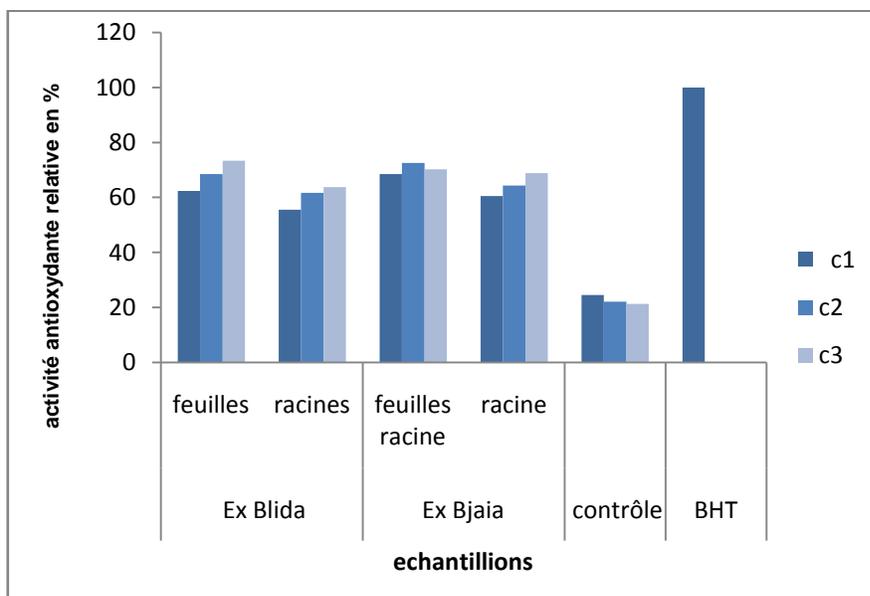


Figure36 : Histogramme de l'activité antioxydante relative des extraits phénoliques des deux plantes.

Contrairement aux huiles essentielles, on remarque que l'activité antioxydante relative des extraits phénoliques des feuilles de *Thapsia garganica L* des deux régions, est plus importante que celles de leurs racines. A titre d'exemple elle est de 73,39% pour les extraits phénoliques des feuilles et de 63,76% pour les racines chez la plante de Blida à concentration C3 (0.05 mg/ml).

V. 4.3. Test de réduction de fer (FRAP) :

C'est une analyse de l'activité antioxydante qui est rapide, reproductible, et facile à exécuter. Cette méthode est basée sur la capacité des huiles essentielles et des extraits phénoliques de réduire le fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} .

Dans notre travail nous avons opté de tester les huiles essentielles et les extraits phénoliques des feuilles et des racines de *Thapsia garganica L* des deux régions.

Les valeurs obtenues ont permis de tracer les histogrammes représentés dans la figures39 pour les huiles essentielles et la figure40 pour les extrais phénoliques.

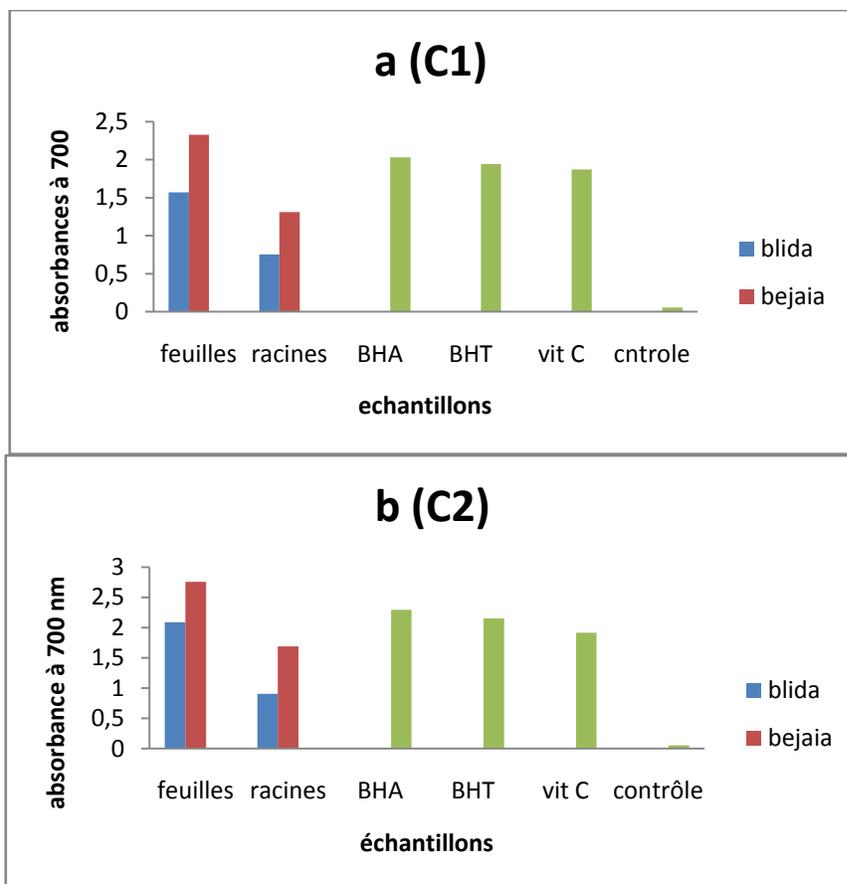


Figure37: Histogrammes représentant le pouvoir réducteur des huiles essentielles, BHA, BHT et de l'acide ascorbique.

Sachant que l'activité augmente avec l'augmentation de l'absorbance. On note un effet réducteur important de nos échantillons puisque l'absorbance du blanc négatif est de 0,05 nm alors que l'échantillon actif de l'huile essentielle des racines de Bejaia par exemple est de 1,68 nm. Cet effet réducteur de nos échantillons est si important qu'il a dépassé celui de BHT et BHA. Le pouvoir réducteur de l'espèce *Thapsia garganica L* est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants. Inversement au deux tests précédents, l'activité des huiles essentielles des feuilles des deux plantes est supérieure à celle de leurs racines. Ceci peut être justifié par la présence de composés donneurs d'électrons dans les feuilles plus que dans les racines. Par contre, comme aux deux précédents tests, l'activité des huiles essentielles

des feuilles de la plante de Bejaia est supérieure à celle de Blida

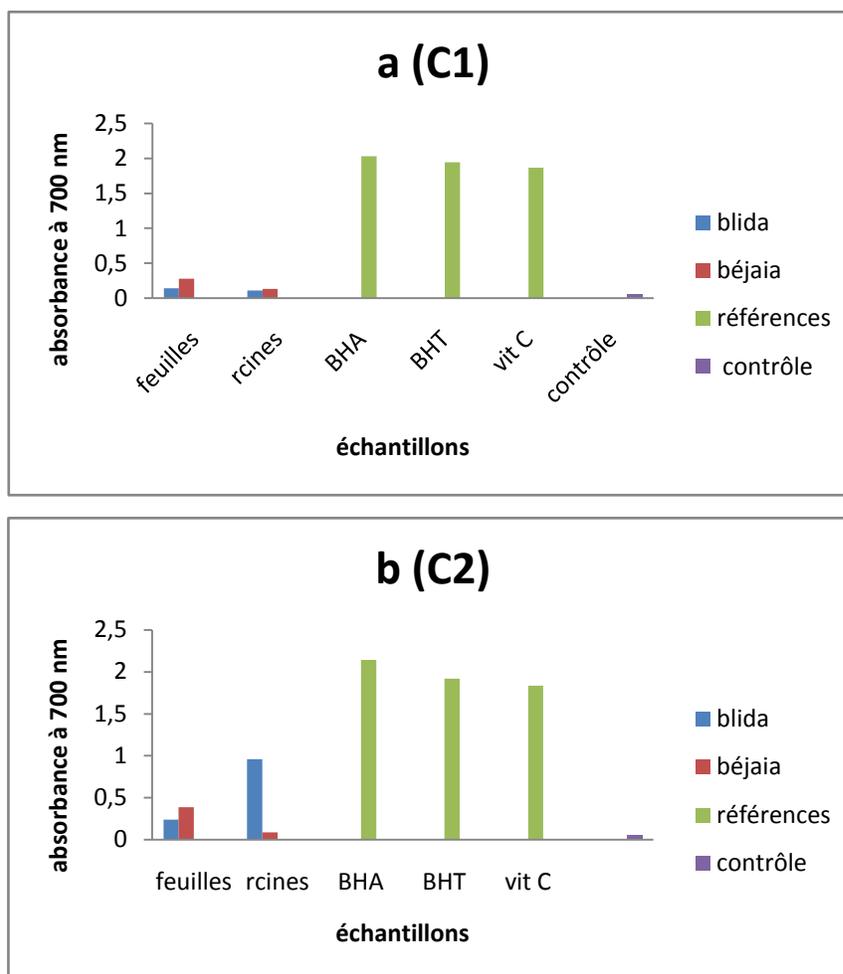


Figure 38 : Histogrammes représentant le pouvoir réducteur des extraits phénoliques, BHA, BHT et de l'acide ascorbique.

Comme aux deux tests précédents, l'activité antioxydante des extraits phénoliques des feuilles des deux plantes est supérieure à celle de leurs racines elle augmente proportionnellement au taux de concentration des extraits phénoliques.

V.5. Etude de l'activité antimicrobienne :

V.5.1. Aromatogramme :

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits phénoliques des feuilles et des racines de *Thapsia garganica* L des deux régions a été testés contre sept germes cibles : trois bactéries Gram⁻, deux levures et deux champignons (*aspergillus niger*, *penicellium* sp).

Le test de l'activité antimicrobienne de l'extrait phénolique a montré que ce dernier ne présente aucune activité antifongique ou antimicrobienne contrairement à l'huile essentielle. La mesure des diamètres des zones d'inhibitions de croissance des germes ciblés permet d'évaluer cette activité.

- **Activité antibactérienne :**

Les bactéries utilisés dans le teste antimicrobiennes sont ; Escherichia coli, Salmonella, Pseudomonas aeuroginosa.

Les aromatoigrammes obtenus sont regroupés dans la figure 40.

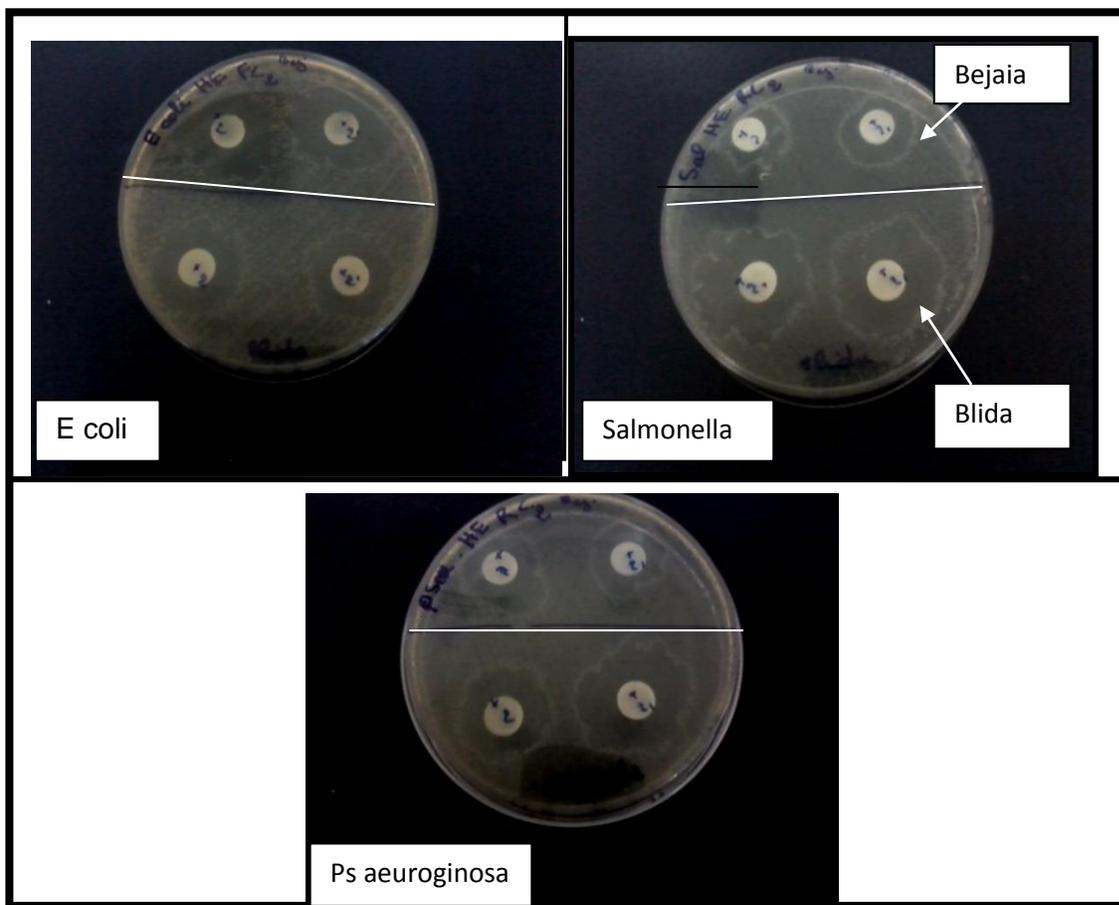


Figure 39 : Photos montrant l'effet des huiles essentielles de thapsia garganica L des deux régions sur Ecoli, Salmonella, Ps aeuroginosa

Les valeurs des diamètres des zones d'inhibitions de la croissance de ses germes est donnée dans le tableau n°11 et l'histogramme représentée Ci-dessous :

Tableau N°11 : variation des diamètres des zones d'inhibitions de la croissance des bactéries par les huiles essentielles des feuilles et des racines de *Thapsia garganica L*

Les germes testés	Concentration (mg/ml)	Bejaia		Blida	
		Feuille	Racine	Feuille	Racine
Escherichia coli	30	-	-	-	-
	70	2.8	1.9	2.2	2.4
Salmonella	30	1.2	-	-	1.3
	70	2.6	1.9	2.4	2.1
Pseudomonas aeruginosa	30	-	1.1	-	1.2
	70	2.6	2.9	2	2.6

des deux régions.

(-) pas d'inhibition

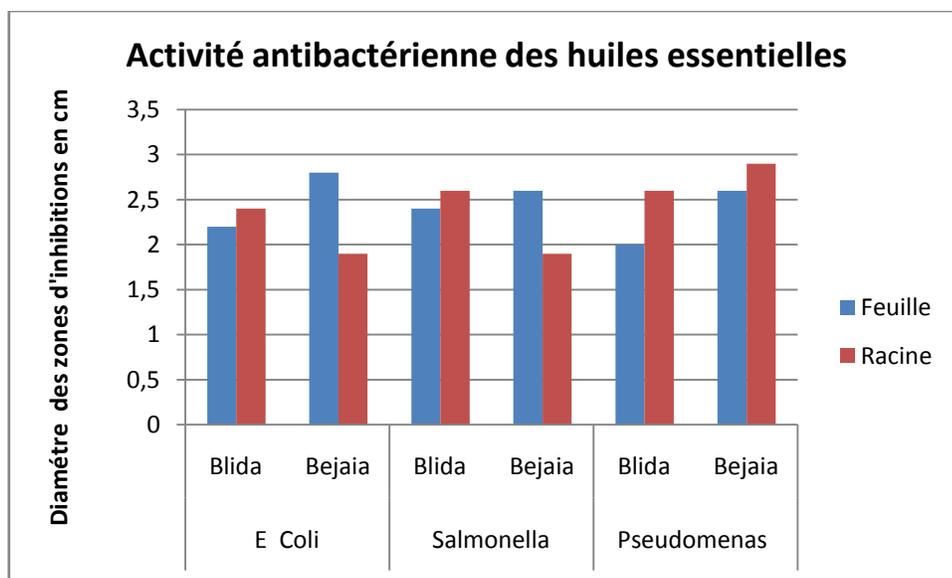


Figure 42 : histogramme de la variation des diamètres des zones d'inhibitions de la croissance des bactéries par les huiles essentielles des feuilles et des racines de *Thapsia garganica L* des deux régions.

D'une façon générale nos huiles essentielles ne présentent pas d'activité antibactérienne à la concentration ($C_1=30\text{mg/ml}$). Sauf pour les huiles essentielles des feuilles de Bejaia et des racines de Blida qui présente une activité contre *Salmonella*, et les huiles essentielles des racines de Blida et de Bejaia présente une activité contre *Pseudomonas*.

On remarque aussi que les huiles essentielles des racines de Blida présente une meilleure activité antibactérienne par rapport à celle des feuilles. Alors que l'huile essentielle des racines de Bejaia présente une activité inférieure a celle de l'huile essentielle des feuilles contre *E. coli* et *Salmonella*, mais son activité dépasse celle de l'huile essentielle des feuilles contre *Pseudomonas*.

La comparaison de l'activité antibactérienne des huiles essentielles des deux régions montre que l'huile essentielle des racines de Blida à une meilleure activité que celle de l'huile essentielle des racines de Bejaia contre *E. coli* et *Salmonella*, Mais on trouve l'inverse avec *Pseudomonas*. Alors que l'huile essentielle des feuilles de Bejaia présente une meilleure activité que celle des huiles essentielles des feuilles de Blida contre tous les bactéries testées.

Cette variation des activités peut être expliquée par la variation de la composition chimique des huiles essentielles et des mécanismes d'actions de ces molécules contre les germes testées.

- **Activité antifongiques :**

Les levures et les champignons utilisés dans le test antimicrobien sont : *Candida albican*, *Candida tropi*, *Aspergillus niger*, *Penicellium sp.*

Les aromatoigrammes obtenus sont regroupés dans la figure n°41

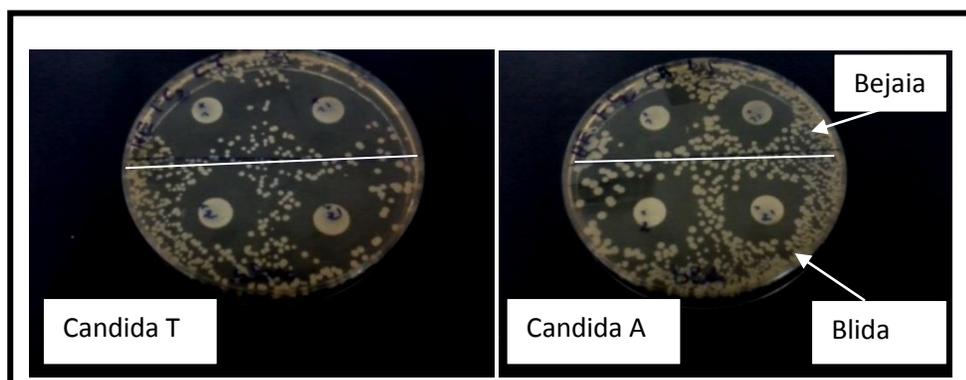




Figure 43 : Photos montrant l'effet des huiles essentielles de *Thapsia garganica* L des deux régions sur *Candida albicans*, *Candida tropicalis* et *Aspergillus niger*

Les valeurs des diamètres des zones d'inhibitions de la croissance de ses germes est donnée dans le tableau n°12 et l'histogramme représentée Ci-dessous :

Tableau N°12 : variation des diamètres des zones d'inhibitions de la croissance des levures et des champignons par les huiles essentielles des feuilles et des racines de *Thapsia garganica* L des deux régions Blida et Bejaia.

Les germes testés	Concentration (mg/ml)	Bejaia		Blida	
		Feuille	Racine	Feuille	Racine
Candida albicans	30	-	1.2	-	1.9
	70	2.5	2.2	2.4	2.8
Candida tropi	30	-	-	-	-
	70	2.9	1.1	2.4	2
Aspergillus niger	30	-	-	-	-
	70	1.2	1.4	1.4	1.5
Penicellium sp	30	-	-	-	-
	70	-	-	-	-

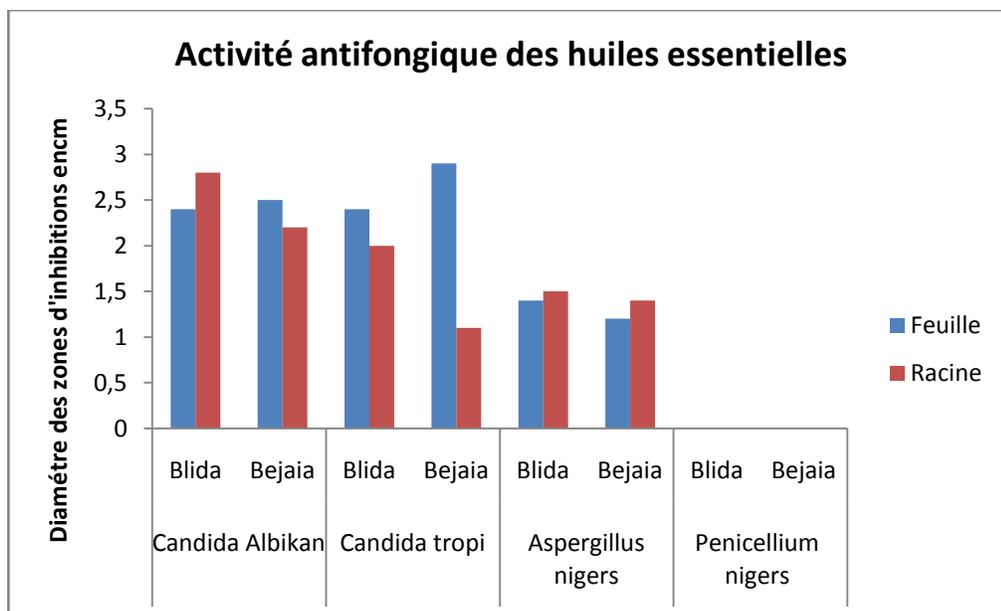


Figure42 : histogramme de la variation des diamètres des zones d'inhibitions de la croissance des levures et champignons en fonctions des différentes concentrations de l'huile essentielle.

L'huile essentielle utilisée dans ce test présente une activité très variable, alors que les deux levures utilisées appartiennent à la même famille, l'activité de nos huiles essentielles contre ces deux germes varie considérablement.

On trouve que l'huile essentielle des feuilles de Bejaia présente une meilleure activité par rapport aux autres huiles essentielles. Alors que l'huile essentielle des racines de Blida présente une meilleure activité que celle de l'huile essentielle des feuilles contre *Candida albican*, l'inverse est obtenu contre *Candida tropi*.

Pour la région de Bejaia on remarque que l'activité des huiles essentielles des feuilles et des racines de Bejaia sont assez proche contre *Candida albican*, mais nettement différente avec la prédominance des feuilles contre *Candida tropi*.

L'activité contre *Aspergillus nigers* a montré que les diamètres des zones d'inhibitions de la croissance de ce germe sont assez proches pour les quatre huiles essentielles (1.4 – 1.2 – 1.5 – 1.4) pour les huiles des feuilles de Blida, feuille de Bejaia, racine de Bejaia, racine de Blida respectivement. Alors que le germe *Penicillium* présente une résistance à l'huile essentielle.

V.5.2. Concentration minimale inhibitrice (CMI) :

La détermination de la concentration minimale inhibitrice est réalisée par la méthode de dilution en milieu gélosé. Les concentrations utilisés été tellement faible qu'on ne peut pas déterminer la concentration minimale inhibitrice.

Les faibles rendements de ces huiles essentielles ne nous pas permet de faire ce test.

Conclusion :

Le stress oxydatif réfère à une perturbation dans la balance métabolique cellulaire durant laquelle, la génération d'oxydants accable le système de défense antioxydant. En raison de la toxicité des antioxydants synthétiques, le recours à des phytonutriments doués d'activités antioxydantes s'avère très avantageux et d'actualité. La plante *Thapsia garganica* L est l'une des plantes qui peuvent être la source de ces antioxydants naturelles. C'est dans ce cadre qu'elle fait l'objet de notre étude.

La détermination des rendements en huile essentielle a montré une rentabilité en celle-ci plus importante chez la plante de Bejaia (0,293% pour les feuilles et 0.107% pour les racines) par rapport a celle de Blida (0.062% pour les feuilles et 0.078 pour les racines).

La teneur en phénols totaux des extraits phénoliques de *Thapsia garganica* L de Bejaia (29,40pour les feuilles et 20,21pour les racines) est supérieur de Blida (26,29 pour les feuilles et 18,79 pour les racines) cette teneur est plus importante dans les feuilles par rapport aux racines chez les deux plantes.

L'étude de pouvoir antioxydant de l'huile essentielle et l'extrait phénolique de *Thapsia garganica* L par les méthodes de péagage du radical DPPH, β carotaine et FRAP a montré que la plante de Bejaia est d'un pouvoir antioxydant supérieur à celle de Blida.

En ce qui concerne l'activité antimicrobienne, l'huile essentielle extraite de la plante de Bejaia s'est avéré un agent antibactérien plus efficace contre E. coli et salmonella que celle extraite de la plante de Blida qui a un effet inhibiteur plus important à l'égard de pseudomonas aeuroginosa comme elle procède un effet antifongique plus important que celle de Bejaia.

A la suite de ces résultats, il serait donc intéressant de mener une enquête détaillée sur les fractions des extraits naturels démontrant l'activité antimicrobienne et antifongique en vu d'identifier l'empèse chimique ou les composés responsables de cette activité.

Notre résultat expérimental nous permet de prédire que les huiles essentielles sont plutôt antimicrobiennes alors que les phénols sont des agents antioxydants de première classe.

Enfin, les huiles essentielles et les extraits phénoliques de *Thapsia garganica* L qui procèdent un pouvoir antioxydant et antimicrobien peuvent être utilisé comme aditifs alimentaire naturels au lieu des antioxydants synthétiques présentant des risques et effets néfastes pour la sente humaine.

- 1. Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin P. et Loumri A. (2007).** Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du rhumatisme*, 74 :636-643.
- 2. Astrid P-M, Hébuterne X. (2007).** Nutrition en pathologie digestive, 255p.
- 3. Athena,S. Chalghen I, Kassah L.A, Lroui S et Khebri S.(2010).** Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits *Cuminumcyminum L.* *labanese science journal*, Vol.11.
- 4. Balasundram N,Sundram K.and Samams. (2006).**phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 99:192-203.
- 5. Barouki R.2006.** Stress oxydant et vieillissement. *Medecine science* p 266-272.
- 6. Bauer W.J., Baddoud R, LÖligerJ. (2010).**science et technologie des aliments : principe de chimie des constituants et de technologie des procédés.edition Alain etournaud : 214-215.
- 7. Bekhchi C et Abdelouahid D. (2010).** Les huiles essentielles, Edition office des publications universitaires. 55p
- 8. Benjlali.B., (2004).** Extraction des plantes aromatiques et médicinales : cas particulier de l'entraînement à la vapeur d'eau et ses équipements. Institut agronomique et vétérinaire, Maroc
- 9. Beniston., NT et WS. (1984).** Fleurs d'Algérie. entreprise nationale du livre : 263p
- 10. Benlemnli M., Ghanan J.** Polyphénols d'huile d'olive. *Medicatrix*

- 11. Berger, M.M. (2006).** Manipulation nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. Nutrition clinique et métabolisme, 20 :48-53.
- 12. Bonnefont T. Rousslot D. (2007).** Stress oxydant et vieillissement. Spectre biologique ,157 :23-26.
- 13. Branger A, Richer M et Rousel S.(2007).** Microbiochimie et alimentation. Educagri édition. Dijon .80p
- 14. Bourgois C-F. (2003).** Les vitamines dans les industries agroalimentaires. édition Lavoisier : 5.
- 15. Brouki, R. (2006).** stress oxydant et vieillissement. Médecine science ,22 :266-272.
- 16. Bruneton J., 1999.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Ed. Tec & Doc. ; p: 461-769.
- 17. Bruneton J., 1993.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2ème édition Lavoisier, 278-292P.
- 18. Bossu C.M., Ferreira E.C., Chaves F.S., Menezes E.A and Nogueira A.R.A. (2006).** Flow injection system for hydrolysable tannin determination .microchemical journal, 84:88-92
- 19. Bougandoura N. Bendimerad N,(2012).** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanoliques de *Satureja Calcamantha* ssp. Nature et technologie .p 14-19
- 20. Carrière A., Galinier A., Fernandez Y., Carmona M., Pénicaed L., Casteilla L. (2006).** Les espèces actives de l'oxygène. medecine science, volume 22, P47-53.
- 21. Gomez F. L. M. 2007.** Sintesis d'analogos de las taspigarginas. Mémoire en vue d'obtention du grade de doctorat en chimie. Département de chimie organique. Faculté des sciences. Université de Cadiz. puerto real. Espagne.

- 22. Crété P. 1965.** Précis de botanique, systématique des angiospermes. Tome II. P 301.
- 23. Curtay J-P, et Robin J-M. (200).** Intérêt des antioxydants. Nutrithérapie.
- 24. Danièle Festy. (2010).** Les huiles essentielles ça marche! L'aromathérapie : tous les bons gestes pour se soigner autrement. Leduc .S ditions : p13-14.
- 25. Defraigne .D.O, J.Pincemail. (2007).** stress oxydant et antioxydant : mythes et réalités. Revue Med liege ; 62(4) :1-10.
- 26. Delattre J., Durand G et Jardillier J-C. (2003).** Biochimie pathologique : Aspects moléculaires et cellulaires .In : radicaux libres et antioxydants : Flammarion Medecine - science : 59-81.
- 27. Derbel S .et Ghedira K. (2005).** les phytonutriments et leur impact sur la santé. phytothérapie et nutrition ,1 :28-34.
- 28. Encyclopédie. (2011).** Des plantes médicinales. Identification, préparation, soins Larousse.84p.
- 29. Favier. (2003).** Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique : 108-115.
- 30. Fulbert J.C and Cals M.J. (1992).** Les radicaux libres en biologie Clinique, 49 (1) : 66-77.
- 31. Gardés-Albert M.,Bonfont- Rousselot D., Abdinzadeh Z .and Jore D.(2003).** Espèces réactives de l'oxygène. comment l'oxygène peut devenir toxique ? l'actualité chimique : 91-96.

- 32. Jacques R, Poortmans et Boisseau N.(2003).** Biochimie des activités physiques. Boeck université S.A. 411-420.
- 33. Kanoun K. (2011).** Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus Communis L.* (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine). Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Magister En biologie. Option substances naturelles, activités biologiques et synthèse.
- 34. Lacolley P. (2007).** Biologie et pathologie du cœur et des vaisseaux. John Libbey eurotext.paris.243.
- 35. Laid. I. (2012).** Etude des activités antioxydante et antifongiques de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis*. Nature et technologie.
- 36. Leborgne .L,Maziere J-C, Maziere C et Andrejak M.(2002).** Stress oxydant, athérogenese et facteurs de risque cardiovasculaire. Tome 95, n°=9. 807.
- 37. Macheix J.J., Fleuriet A et Sarni-Mandchado P.(2006).** Composés phénoliques dans la plante, structure, biosynthèse, répartition et rôle. In : les polyphénols en agroalimentaire. Edition Technologie et document. Paris, numéro de page
- 38. Marc F., Davin A., Benbrahim L.D., Ferrand C., Baccaunaud M., Fritsch P.(2004).** Methode d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliment, medicine science, Vol 20, n°4 : P458-463
- 39. Martin S. et Andriantsitohaina R. (2002).** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. Annales cardiologie et d'angéiologie, 51 :304-315.
- 40. Michel J-L, Haberkorn V., (2007).** L'aromathérapie et les huiles essentielles (61) : 7-14.
- 41. Milane H. (2004).** La quercétine et ses dérivés : molécule à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres. Etude de l'application thérapeutique .Thèse de doctorat .université Louis pasteur, Domaine : pharmacochimie.
- 42. Moussard C. (2006).** Biochimie structurel et métaboliques. Edition de Boeck université : 335-341p.

- 43. Moreau P. (1993).** Micronutrition chimique en biologie et en pratique chimique. Edition Lavoisier Technologie et document.
- 44. Morena M., Martin-Mateo M., Cristol J-p et Canaud B. (2002).** Stress oxydant, hémo-incompatibilité et complications de la dialyse au long cours. Néphrologie, 23(5) : 201-208.
- 45. Paris R.R et Moys. (1981).** Précis de matière médicale, tome II : pharmacognosie spéciale spermaphytes (suite) : Angiospermes : Monocotylédones-Dicotylédone Apétales et Diap tales. 2 me édition. Masson- paris. 487-488p.
- 46. Paule L-M, Bachman P. (2012).** Nutrition chez le patient adulte atteint de cancer : complément alimentaire antioxydants pendant et au décours du traitement des cancers. Nutrition chimique et métabolisme 26 : 238-246p.
- 47. Paul C-J, Marc R-J. (2000).** Int ret des complexes antioxydants. Neutrath rapie
- 48. Pelletier E, Peter G-C, Denizeau F. (2004).** Ecotoxicologie moléculaire : principes fondamentaux et perspectives et développement. Press de l'université du Québec.
- 49. Philippe R, Mitry E . (2006).** Les cancers digestifs. Edition Springer- Verbag France : 62.
- 50. Pincemail.J, LecomteJ, Collart E, Castiaux J-P, Defraigne J-O. (2001).** Stress oxydant, antioxydants et exercice physique : Vaisseaux, cœur, poumons, 6(5) : 1-3.
- 51. Roux D., J-P chaumont, Ccleur.J.Millet, J-M. Morl et D.Tillec. (2008).** Conseil en aromathérapie .2 me édition .Wolters Kluwer France. 14-15p.
- 52. Roux D, Catier O. (2007).** Botanique pharmacognosie phytothérapie. Edition Wolters Kluwer.

53. Russo-F- Marie, André- Paul Petier, BarbaraS-Polla. (1998). L'inflammation. Edition John libbey . Eurotext. Paris: 290-293p.

54. Saika K. (2001). Extraction des huiles essentielles par distillation: 1-6p.

55. Saliva HD., Cerqueira MA., Souja B. (2011). Nanoemulsions of β carotène using a height-energy emulsification- evaporation technique.

56. Soubeiran E.(1840). Nouveau traite de pharmacie .seconde edition

57. Tarber, M.G., Frei, B. et Bechman, L.S., (2008). Vitamin E revisited: do new data validate benefits for chronic disease prevention? Curr opin. Lipido., V.119,30-38p.