

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

UNIVERSITE SAAD DAHLAB –BLIDA-

FACULTE DES SCIENCES AGROVETERINNAIRES

DEPARTEMENT DES SCIENCES AGRONOMIQUES

**Activité biologique des huiles essentielles et des extraits phénoliques de
« *Thapsia garganica L* » de différente récolte et leur toxicité.**

Projet de fin d'études en vue de l'obtention

Du diplôme d'ingénieur d'État en agronomie

Spécialité : sciences alimentaires

HAMIMED Sara

IGHMER Samira

Devant le jury composé de :

| | | | |
|------------------------------------|--------------------------------|-------------|--------------------------|
| M^r. RAMDAN S. | Maitre assistant B | USDB | Président du jury |
| M^r. KADRI B. | Maitre de conférences B | USDB | Promoteur. |
| M^{me} AIT YAHIA.K. | Maitre assistante A | USDB | Co-promotrice. |
| M^r BOUSBIA N | Maitre assistant B | USDB | Examineur. |
| M^r. BENDALI A. | Maitre-assistant A | USDB | Examineur. |
| M^r. AMALOU. | Maitre-assistant A | USDB | Examineur. |

ANNEE UNIVERSITAIRE 2012/2013

Remerciement

Avant toutes choses, on tient à remercier Dieu le tout puissant, pour nous avoir donné la force, le courage et surtout la patience afin de pouvoir réaliser ce mémoire.

Ce travail a été réalisé principalement entre l'école nationale supérieure KOUBA et le laboratoire de chimie (Université de Blida).

Nos remerciements vont en particulier à :

Mr KADRI I, maître de conférences à l'université de Blida, pour avoir accepté de nous encadrer, pour nous avoir encouragés par ses précieux conseils.

On ne remerciera jamais assez Mme AIT YAHIA.K née HAMZA, maître assistante au niveau de département de chimie (Université de Blida) pour la grande aide, sa générosité et surtout sa gentillesse.

On tient à remercier Mr AIT YAHIA.A maître assistant à Blida (département de chimie), pour ses orientations, son aide, et surtout sa gentillesse.

Mr RAMDANE.S, pour avoir accepté de présider notre jury ainsi que les membres du jury pour l'honneur qu'ils nous font de juger ce travail.

Nos sincères remerciements à nombreuse personnes qui ont aidé à l'aboutissement de ce mémoire on particulier Mme SAADI.L.

On tient à exprimer notre profonde gratitude à nos parents, pour nous avoir encouragés et d'être toujours avec nous.

A nos très chers amis et à toute personne qui a participé de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

Résumé

Dans le but de la valorisation des plantes spontanées de la flore algérienne, une étude sont menée sur l'espèce *Thapsia garanica* L, appartenant à la famille des Apiaceae et connue pour ces effets thérapeutiques et médicinaux. En médecine Traditionnelle, cette plante n'est utiliser qu'une fois par an (le début de printemps). Sachant que sont infusion dans l'eau est très toxique, ils exploitent que les composées volatiles de la partie souterraine.

Sur cela, nous avons fait une étude comparative des activités antioxydants et antibactériennes des HE et des EXT phénoliques des racines et des feuilles au cours de l'année ainsi que leur toxicité sur le foie.

Des récoltes ont étaient réaliser pendant l'année courante à différente dates (17 Février, 17 Mars, 21 Mars et 25 Mars) dans la région piémont de la chaine montagneuse de Chréa, wilaya de Blida en Algérie, l'extraction de son HE par hydrodistillation montage Clévengr à montrée que le rendement croit au file des récoltes jusqu'à 0.078% dans les feuilles-tiges et 0.0644% dans les racines à la récolte du 25 mars.

La détermination du taux des phénols totaux dans les EXT phénoliques récupérés à partir des extraits méthanoliques obtenus par l'extraction à l'aide du *soxhlet*, ont donné un rendement le plus élevé pour les feuilles-tiges et les racines à la récolte du 21 mars de 0.2637 et 0.2415 mg EGA/g d'extrait respectivement.

L'activité antioxydantes réalisée par les trois méthodes piégeage du radicale DPPH, FRAP et blanchiment de β -carotène ont montrés que les HE des feuilles-tiges sont moins actif que les HE racines à partir du 21 mars et que les racines de augmentent leurs activité au file des dates. Par contre les EXT phénoliques des feuilles sont dans toutes les récoltes, plus actifs que ceux des racines et leur meilleure activité est atteinte à la récolte du 21 mars.

Le teste microbiologique à montré que les extraits phénoliques de cette plante ne présentent pas une activité inhibitrice alors que les HE ont une inhibition similaires

L'hyptotoxicité à montrer que les EXT de toutes les récoltes ont une forte toxicité sur le foie et les HE des racines des récoltes 21 mars et ceux de 25 mars non et pour tout ce qu'il reste comme échantillon des HE sont toxique.

ملخص

العنوان: النشاط البيولوجي للزيوت الأساسية و المستخلصات الفينولية لنبته البونافع لعدة محاصيل كذلك سميتها على الكبد

بههدف تثمين الغطاء النباتي الجزائري، قمنا بدراسة نبتة جزائرية برية: نبتة البونافع التي تنتمي إلى عائلة Apiaceae المعروفة بخصائصها الطبية و الشفائية في الطب التقليدي، هذه النبتة لا تستعمل إلا مرة واحدة في السنة (أول يوم في الربيع). علما أن تقيعها في الماء يعطي مستخلص كثير السمية ، لا يتم استغلال إلا المركبات الطيارة للجذور.

اعتمادا على هذا، قمنا بمقارنة الفعالية ضد التأكسدية، الفعالية ضد المكروبات للزيوت الأساسية و المستخلصات الفينولية لجذور و أوراق هذه النبتة المقطوفة خلال السنة، وكذلك سميتها على الكبد.

قمنا بقطف هذه النبتة في السنة الجارية عند مختلف التواريخ (17 فيفري، 17 مارس، 21 مارس و 25 مارس) في سفوح سلسلة جبال الشريعة، البلدية في الجزائر.

استخلاص الزيوت الأساسية بطريقة التقطير المائي و بواسطة جهاز «الكليفنجر» أعطت مردود متصاعد على ممر تواريخ القطف ليصل إلى 0.078% على مستوى الأوراق و 0.0644% عند الجذور في 25 مارس.

تم تحضير المستخلصات الفينولية بواسطة جهاز «السوكسكلي» بالميثانول. تحديد كمية الفينول أعطى نسب تختلف حسب التواريخ و أجزاء النبتة مع علاوة في 21 مارس بمعدل 0.2637 و 0.2415 مغ/غ مستخلص للأوراق و الجذور على التوالي.

يتم تقييم نشاط ضد الأكسدة بثلاثة طرق مختلفة : طريقة الجذور الحرة DPPH، أكسدة الحديد الحديد إلى الحديد الحديدية FRAP وطريقة تبييض β -كاروتين ، أظهرت أن الزيوت الأساسية أقل فعالية في الأوراق مقارنة بالجذور ابتداء من 21 مارس، أما مستخلصاتها الفينولية التي هي أكثر فعالية من السابقة فان مستخلصات الأوراق أكثر فعالية من مستخلصات الجذور في كل تواريخ القطف مع بلوغ الذروة في 21 مارس.

و قد أظهرت الاختبارات الميكروبيولوجية بأن المستخلصات الفينولية غير فعالة عكس الزيوت الأساسية التي أظهرت فعاليتها في مختلف تواريخ القطف.

الزيوت الأساسية أظهرت سميتها على الكبد في جميع المحاصيل إلا في جذور 21 و 25 مارس عكس المستخلصات الفينولية التي أظهرت أثارها القوية عليه.

الكلمات الجوهرية: نبتة البونافع، الزيوت الأساسية، المستخلصات الفينولية، النشاط ضد الأكسدة، الفعالية ضد المكروبات، السمية على الكبد

Liste des abréviations

ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament.

Afssaps : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé.

AFNOR : Association Française de Normalisation

ATCC : American Type Culture Collection

BHA : Butylated Hydroxy Anisole

BHT : Butyl Hydroxy Toluène

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

EXT : Extrait naturel de la plante

HE : Huile essentielle

Kg : Kilogramme

MHE : Masse de l'huile essentielle

ml : Millilitre

mn : Minute

Rd : Rendement

SM : Spectrométrie de Masse

Vit C : Acide ascorbique

µl : Microlitre

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : réactifs chimique et appareillage au cours de notre expérimentation..... | 39 |
| Tableau 2 : les concentrations des solutions filles..... | 48 |
| Tableau 3 : Références, allures et pathologies des souches utilisées..... | 50 |
| Tableau 4 : Différents traitements appliqués chez les souris..... | 57 |
| Tableau 5 : les rendements d'extraction des HE par hydrodistillation type <i>Clevenger</i> des différentes parties des différentes récoltes..... | 61 |
| Tableau 6 : les différents rendements en huiles essentielles de <i>Thapsia garganica</i> trouvés dans d'autres études..... | 62 |
| Tableau 7 : les rendements en extraits phénolique des différents échantillons de <i>Thapsia Garganica L</i> | 63 |
| Tableau 8 : Résultat de la teneur en phénols totaux de l'extrait..... | 64 |
| Tableau 9 : les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode DPPH sur les huiles essentielle de <i>Thapsia Garganica L</i> | 66 |
| Tableau 10 : les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode DPPH sur les extraits phénoliques de <i>Thapsia Garganica L</i> | 68 |
| Tableau 11 : les résultats de l'activité relative des huiles essentielles..... | 75 |
| Tableau 12 : les différents résultats de l'activité antioxydante..... | 77 |
| Tableau 13 : les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode FRAP sur les huiles essentielles de <i>Thapsia Garganica L</i> | 78 |
| Tableau 14 : les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode FRAP sur les extraits phénoliques de <i>Thapsia Garganica L</i> | 80 |
| Tableau 15 : la variation des diamètres des zones d'inhibitions de la croissance des germes par les huiles essentielles des feuilles et des racines de <i>Thapsia garganica L</i> des 4 récoltes..... | 80 |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1: illustration schématique du développement des glandes productrices d'HE..... | 3 |
| Figure 2: Localisation interne d'HE au niveau des cellules sécrétrice..... | 3 |
| Figure 3: structure et d'un isoprène..... | 5 |
| Figure 4 : Exemple de structures des composants monoterpéniques rencontrées dans les HE..... | 5 |
| Figure 5: Exemple de structures des composants sesquiterpéniques rencontrées dans les HE..... | 6 |
| Figure 6 : Exemple de structures des composés aromatique rencontrées dans les HE..... | 6 |
| Figure 7: Exemple de quelque composées diverses rencontré dans les HE..... | 7 |
| Figure 8: schéma d'un montage d'hydrodistillation ou distillation simple..... | 12 |
| Figure 9: Appareil végétatif des Apiacées..... | 16 |
| Figure 10: Inflorescence et appareil reproducteur des Apiacées. | 17 |
| Figure 11 : classification botanique de <i>thapsia garganica L</i> | 19 |
| Figure 12: photographies des différent parties de <i>Thapsia garganica L</i> ; a) tige, b) feuilles, c) fruit, d) fleur, e) racine..... | 21 |
| Figure 13: structure du squelette de thapsigargin de <i>Thapsia garganica L</i> | 24 |
| Figure 14: structure des transtaganolides A et B de <i>Thapsia garganica L</i> | 24 |
| Figure 15: structure des lactones sesquiterpéniques de <i>Thapsia garganica L</i> | 24 |
| Figure 16: structure des autres lactones sesquiterpéniques de <i>Thapsia garganica L</i> | 25 |
| Figure 17: Les phénylpropanoïdes de <i>thapsia garganica L</i> | 26 |
| Figure 18 : exemple de structure des lipides de <i>thapsia garganica L</i> | 27 |
| Figure 19: Cytotoxicité comparée de la Tg sur plusieurs souches cellulaires..... | 28 |
| Figure 20: localisation des pompes SERCA..... | 29 |
| Figure 21 : Vue de face de l'anatomie du foie..... | 30 |

| | |
|---|----|
| Figure 22 : Lieu de prélèvement de <i>Thapsia garganica L</i> | 38 |
| Figure 23 : obtention des HE par hydrodistillation montage Clevenger..... | 41 |
| Figure 24 : Obtention des extraits bruts de <i>Thapsia garganica L</i> par montage Soxhlet. a) extrait brut des feuilles de couleur jaune verdâtre ; b) extrait brut des racines de couleur jaune brun ; c) schéma d'un soxhlet..... | 43 |
| Figure 25 : réaction de réduction d'un radical DPPH en présence d'un antioxydant ainsi que leur colorimétrie..... | 47 |
| Figure 26 : illustration de la méthode d'Aromatogramme sur boîte Pétri..... | 54 |
| Figure 27 : histogramme du rendement d'extraction des HE des feuilles et des racines des différentes récoltes par hydrodistillation type Clevenger..... | 61 |
| Figure 28: Les histogrammes des rendements en extraits phénolique des différents échantillons de <i>Thapsia Garganica L</i> | 63 |
| Figure 29 : la courbe d'étalonnage de l'acide gallique..... | 64 |
| Figure 30 : Teneur en phénols totaux dans les différents extraits phénolique de <i>Thapsia Garganica</i> (mg Équivalent d'étalon/ g d'extrait). | 65 |
| Figure 31 : L'histogramme de l'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode DPPH sur les huiles essentielle de <i>Thapsia Garganica L</i> | 67 |
| Figure 32 : L'histogramme de l'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode DPPH sur les extraits phénoliques de <i>Thapsia Garganica L</i> | 69 |
| Figure 33 : L'histogramme de l'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode DPPH sur les extraits phénoliques de <i>Thapsia Garganica L</i> | 70 |
| Figure 34 : mécanisme expliquant l'activité antiradicalaire des phénols..... | 71 |
| Figure 35 : l'évaluation de la dégradation de la couleur de du β -carotène en présences des huiles essentielles pondant 48 heures..... | 72 |
| Figure 36 : l'évaluation de la dégradation de la couleur de du β -carotène en présences des extraits phénoliques pondant 48 heures..... | 74 |
| Figure 37: les histogrammes représentant l'activité relative des huiles essenteilles..... | 76 |
| Figure 38 : les histogrammes représentant l'activités des extraits phénolique..... | 77 |

| | |
|--|----|
| Figure 39 : L’histogramme de l’évaluation de l’activité antioxydante par la méthode FRAP sur les huiles essentielles de <i>Thapsia Garganica L.</i> | 79 |
| Figure 40 : L’histogramme de l’évaluation de l’activité antioxydante par la méthode FRAP sur les extraits phénoliques de <i>Thapsia Garganica.</i> | 81 |
| Figure 40 : Photos montrant l’effet des huiles essentielles de <i>thapsia garganica L</i> des 04 récolte, des sur <i>Echirichia coli</i> | 81 |
| Figure 42 : Structure d’un parenchyme hépatique d’une souris témoin. Coloration : HE ; Grossissement : x400 (a et b)..... | 87 |
| Figure 43 : Structure d’un parenchyme hépatique d’une souris traitée par l’huile essentielle des feuilles de <i>Thapsia garganica L</i> récoltées du 17 février Coloration : HE ; Grossissement : x400 (a, b et c)..... | 89 |
| Figure 44 : Structure d’un parenchyme hépatique d’une souris traitée par l’huile essentielle de feuilles de <i>Thapsia garganica</i> récoltées du 25/03 Coloration : HE ; Grossissement : x400 (a et b)..... | 89 |
| Figure 45 : Structure d’un parenchyme hépatique d’une souris traitée par l’huile essentielle des feuilles de <i>Thapsia garganica</i> récoltées le 21 mars Coloration : HE ; Grossissement : x400 (a et b) | 90 |
| Figure 46 : Structure d’un parenchyme hépatique d’une souris traitée par l’huile essentielle de feuilles de <i>Thapsia garganica</i> récoltées le 21 mars Coloration : HE ; Grossissement : x400 (a et b) | 90 |
| Figure 47 : Structure d’un parenchyme hépatique d’une souris traitée par l’huile essentielle des racines de <i>Thapsia garganica</i> récoltées le 17 février Coloration : HE ; Grossissement : x400 (a et b)..... | 91 |
| Figure 48 : Structure d’un parenchyme hépatique d’une souris traitée par l’huile essentielle de racines de <i>Thapsia garganica</i> récoltées le 17 février Coloration : HE ; Grossissement : x400 (a et b)..... | 92 |
| Figure 49 : Structure d’un parenchyme hépatique d’une souris traitée par l’huile des racines de <i>Thapsia garganica</i> récoltées le 25 mars Coloration : HématoE ; Grossissement : x400 (a et b)..... | 92 |
| Figure 50 : Structure d’un parenchyme hépatique d’une souris traitée par l’huile de racines de <i>Thapsia garganica L</i> récoltées du 21 mars Coloration : HE ; Grossissement : x400 (a et b)..... | 93 |

| | |
|--|----|
| Figure 51 : Structure d'un parenchyme hépatique d'une souris traitée par l'extrait de feuilles de <i>Thapsia garganica</i> récoltées le 17 février Coloration : HE ; Grossissement : x400 (a et b avec zoom)..... | 94 |
| Figure 52 : Structure d'un parenchyme hépatique d'une souris traitée par l'extrait de feuilles de <i>Thapsia garganica</i> récoltées le 21 mars Coloration : HE ; Grossissement : x400 (a et b)..... | 94 |
| Figure 53 : Structure d'un parenchyme hépatique d'une souris traitée par l'extrait de feuilles de <i>Thapsia garganica</i> récoltées le 25 mars Coloration : HE ; Grossissement : x400 (a et b)..... | 91 |
| Figure 54 : Structure d'un parenchyme hépatique d'une souris traitée par l'extrait des racines de <i>Thapsia garganica</i> récoltées le 17 février Coloration : HE ; Grossissement : x400 (a et b)..... | 95 |
| Figure 55 : Structure d'un parenchyme hépatique d'une souris traitée par l'extrait deracines de <i>Thapsia garganica</i> récoltées le 21 mars. a : Parenchyme sain ; b : Parenchyme présente des cellules nécrosées ; c : Présence de congestion sanguine. Coloration : HE ; Grossissement : x400 (a et b)..... | 96 |
| Figure 56 : Structure d'un parenchyme hépatique d'une souris traitée par l'extrait de racines de <i>Thapsia garganica</i> récoltées le 25 mars. Coloration : HE ; Grossissement : x400 (a et b)..... | 97 |

Sommaire

| | |
|-------------------|---|
| Introduction..... | 1 |
|-------------------|---|

Partie Bibliographique

Chapitre I : généralités sur les huiles essentielles

| | |
|--|----|
| I.1. Définition des huiles essentielles..... | 2 |
| I.2. Propriétés physico-chimiques des HE..... | 3 |
| I.3. Localisation et répartition des HE des les plantes..... | 3 |
| I.4. Rôle des HE dans la plante..... | 4 |
| I.5. Composition chimique des HE..... | 5 |
| I.5.1. Terpénoïdes..... | 5 |
| I.5.1.1. Monoterpènes..... | 5 |
| I.5.1.2. Sesquiterpènes..... | 6 |
| I.5.2. Composés aromatiques..... | 7 |
| I.5.3. Composés d'origine diverses..... | 7 |
| I.6. Conservation et stockage d'HE..... | 8 |
| I.7. Toxicité des HE..... | 9 |
| I.8. Domain d'utilisation des HE..... | 9 |
| I.8.1. En pharmacie..... | 9 |
| I.8.2. En cosmétologie..... | 10 |
| I.8.3. Dans les industries agro-alimentaires..... | 10 |
| I.8.4. Dans diverses industries..... | 10 |
| I.9. Facteurs de variabilité des HE..... | 11 |
| I.10. Extraction des huiles essentielles..... | 11 |
| I.10.1. Distillation..... | 11 |
| I.10.1.1. Hydrodistillation..... | 12 |
| I.10.1.2. Entraînement à la vapeur..... | 12 |
| I.10.2. Extraction par solvants volatils..... | 13 |
| I.10.3. Extraction assisté par micro-onde..... | 13 |
| I.10.4. Extraction par du CO2 supercritique..... | 13 |
| I.10.5. Extraction à froid..... | 14 |

Chapitre II : généralités sur *Thapsia garganica* L.

| | |
|---|----|
| II.1. La famille des apiaceae..... | 15 |
| II.1.1. Généralités..... | 15 |
| II.1.2. Description botanique..... | 15 |
| II.2. Généralités sur le genre Thapsia..... | 17 |
| II.3. Thapsia garganica L..... | 17 |
| II.3.1. Etymologie..... | 17 |
| II.3.2. Classification botanique..... | 18 |
| II.3.3. Propriétés..... | 19 |
| II.3.4. Description botanique..... | 19 |
| II.3.5. Utilisation..... | 21 |
| II.3.6. Toxicité..... | 21 |
| II.3.7. Les métabolites secondaires..... | 22 |
| II.3.7.1. les composés terpéniques..... | 22 |
| II.3.7.2. Les Composés phénoliques..... | 24 |
| II.3.8. les lipides de Thapsia garganica L..... | 25 |
| II.3.9. Thapsigargine..... | 26 |

Chapitre III : Activités biologiques et hypatototoxicité.

| | |
|---|----|
| III.1. Activités biologiques des huiles essentielles..... | 28 |
| III.1.1. Activité antioxydante..... | 28 |
| III.1.2. Activité antimicrobienne..... | 29 |
| III.1.3. Activité antifongique..... | 30 |
| III.2. Histopathologie du foie..... | 31 |
| III.2.1. Hypatototoxicité..... | 31 |
| III.2.1.1. Physiologie et anatomie du foie..... | 32 |
| III.2.1.2. Principales lésions hépatique..... | 32 |
| III.2.1.2.1. Stéatose..... | 33 |
| III.2.1.2.2. Nécrose hépatique..... | 33 |
| III.2.1.2.3. Cirrhose..... | 33 |
| III.2.1.3. procédures d'évaluation..... | 33 |

Partie Expérimentale

Matériel et Méthodes

| | |
|--|----|
| 1. Objectif du travail..... | 35 |
| 2. Lieux d'expérimentation | 35 |
| 3. Matériel..... | 36 |
| 3.1. Matériel végétal et identification..... | 36 |
| 3.2. Réactifs chimiques et appareillage..... | 37 |

Partie I : extraction des huiles essentielles et des extraits phénoliques.....

| | |
|--|----|
| I.1. Extraction des huiles essentielles..... | 38 |
| I.1.1. Principe..... | 38 |
| I.1.2. Mode opératoire | 38 |
| I.2. Préparation des extraits phénoliques..... | 40 |
| I.2.1. Principe..... | 40 |
| I.2.2. Mode opératoire | 40 |
| I.3. Dosage des phénols totaux..... | 41 |
| I.3.1. Principe | 41 |
| I.3.1 Mode opératoire..... | 42 |

Partie II : Évaluation de l'activité antioxydante.....

| | |
|--|----|
| II.1. La méthode de piégeage du radicaux DPPH..... | 44 |
| II.1.1. Principe..... | 44 |
| II.1.2. Mode opératoire..... | 44 |
| II.2. la méthode de blanchiment du β -carotène | 45 |
| II.2.1. Principe..... | 45 |
| II.2.2. Mode opératoire | 45 |
| II.3. la méthode FRAP (Ferric reducing antioxidant power)..... | 46 |
| II.3.1. Principe | 46 |
| II.3.2. Mode opératoire..... | 46 |

Partie III : Étude du pouvoir antimicrobien.....

| | |
|---|----|
| III.1. Protocole expérimental..... | 48 |
| III.1.1. L'aromatogramme..... | 48 |
| III.1.2. Dilution sur le milieu gélosé..... | 51 |

| | |
|--|-----------|
| Partie IV : Etude histopathologique du foie..... | 52 |
| IV.1. Matériel..... | 52 |
| IV.1.1. Animaux de l'étude..... | 52 |
| IV.1.2. Échantillons administrés..... | 53 |
| IV.2. Méthodes..... | 54 |
| IV.2. Expérimentation..... | 54 |
| IV.2. Sacrifice et prélèvement des échantillons..... | 54 |
| IV.3. Étude histopathologique..... | 54 |
| IV.3.1. Fixation et rinçage des pièces | |
| IV.3.2. Déshydratation | |
| I.7. Détermination de l'activité anti-inflammatoire..... | 46 |
| I.8. Détermination de l'activité antalgique..... | 48 |

II/Résultats et Discussion

| | |
|--|----|
| II.1. Taux d'humidité..... | 50 |
| II.2. Dosage des différents groupes de composés phénoliques..... | 51 |
| II.2.1. Les composés phénoliques totaux..... | 51 |
| II.2.2. Les flavonoïdes..... | 53 |
| II.2.3. Les anthocyanines..... | 54 |
| II.2.4. Les tannins condensés..... | 55 |
| II.3. Pouvoir réducteur..... | 57 |
| II.4. Activité « scavenging » du radical DPPH..... | 59 |
| -Détermination des IC ₅₀ | 60 |
| II.5. Activités biologiques <i>in vivo</i> | 62 |
| II.5.1. Toxicité aiguë..... | 62 |
| II.5.2. Toxicité subaiguë..... | 65 |
| Bilan rénal :..... | 65 |
| Bilan hépatique :..... | 66 |
| La bilirubine..... | 66 |
| Phosphatases alcalines..... | 67 |
| Les transaminases..... | 68 |
| II.5.3. Activité inflammatoire..... | 69 |
| II.5.4. Activité antalgique..... | 71 |
| Conclusion et perspectives..... | 73 |
| Références Bibliographiques..... | 76 |

Introduction

La flore algérienne renferme une diversité importante de plantes aromatiques et médicinales utilisées d'une manière douée en médecine traditionnelle. Elle représente une source inépuisable de substances riches en propriétés thérapeutiques (S. Iadjel 2011)

Le genre *Thapsia* comprend environ 41 espèces originaires d'Afrique, d'Asie et d'Europe. *Thapsia garganica* L est une plante à fleur appartenant à la famille des apiécées répandue en Algérie sous le nom arabe de « Bou Nafaa » et kabyle « aderyès » connue pour l'utilisation des vapeurs de ses racines une fois par an au début du printemps en cuisine et en médecine traditionnelle. Des études ont montré que les extraits de ces racines ont des propriétés irritantes sur la peau et sont utilisés principalement pour soulager des inflammations articulaires (P. Sabala, 1993), tandis que l'étude toxicologique sur les huiles essentielles de cette plante n'a pas été à notre connaissance, rapportée dans la littérature.

Bien que les activités curatives de cette plantes soient connues depuis très longtemps, ce n'est qu'à la fin des années soixante dix qu'a commencé l'isolement et l'identification des composés responsables de ses activités (F. L. M. Gómez (2007)). Sur cela, nous avons fait une étude comparative des activités antioxydants et antibactériennes des huiles essentielles et des extraits phénoliques des racines et des feuilles et leur toxicité sur le foie au cours de l'année.

Des récoltes ont étaient réaliser pendant l'année courante à différentes dates (17Janvier, 17Février, 17Mars, 21 Mars et 25 Mars) dans la région de **la Méridja** en Algérie en servie de matière végétale première pour notre expérimentation.

Notre étude sera donc fondée sur deux grandes parties, la première est exploitée pour la recherche bibliographique où nous apportant dans le premier chapitre des généralités sur les huiles essentielles .Dans le deuxième chapitre nous apportons des généralités sur la famille les apiécée, le genre thapsia, et l'espèce thapsia garganica L. Le troisième chapitre porte sur les activités biologiques et hypatotoxicité

La deuxième partie se répartira sur matériel et méthode et résultats et discussions.

Enfin on terminera par une conclusion générale.

I.1. Définition des Huiles essentielles

D'après Naves, aucune des définitions des huiles essentielles n'a le mérite de la clarté, ni celui de la précision. Cet auteur définit les huiles essentielles comme des mélanges de divers produits issus d'une espèce végétale, ces mélanges passant avec une certaine proportion d'eau lors d'une distillation effectuée dans un courant de vapeur d'eau. Cette définition peut être étendue aux huiles essentielles obtenues par expression à froid de l'écorce ou zeste des fruits de Citrus, à cause de l'intervention de l'eau dans les procédés mécaniques pour entraîner le produit libéré des alvéoles oléifères **(anonyme 1)**.

La AFNOR NF T 75-006 (février 1998) la définition d'une huile essentielle et comme suit: « 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 premiers modes d'obtention ; elle peut subir des traitements physiques n'entraînant pas de changement significatif de sa composition [par exemple, redistillation, aération, ...] ». Cette définition par procédé est restrictive : car elle exclut aussi bien les produits obtenus par le procédé, extraction et ceux –ci occupent une place considérable sur les marchés de la pharmacie, des produits d'hygiène et de l'industrie cosmétique, de la parfumerie ainsi que dans de nombreux secteurs de l'industrie agro-alimentaire **(BRUNETON, 1999)**.

L'ANSM ancien AFSSAPS a défini l'huile essentielle comme « Produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition, le groupe de travail « Huiles essentielles » a jugé utile de rappeler également la réglementation des HE dans les domaines pharmaceutique et alimentaire qui est susceptible d'apporter des points d'information complémentaires sur ces substances » **(anonyme 2)**.

Les huiles essentielles, appelées aussi essence, sont des mélanges de substances aromatiques produites par de nombreuses plantes et présentes sous forme de minuscules gouttelettes dans la feuilles, la peau des fruits, la résine, les branches, les bois. Elles sont

présentes en petites quantités par rapport à la masse du végétal : elles sont odorantes et très volatiles, c'est-à-dire qu'elles s'évaporent rapidement dans l'air (**BEKHECHI et al. 2010**).

I.2. Propriété physico-chimique des HE

- Les huiles essentielles sont des substances de consistance huileuse, plus ou moins fluides, voire résinoïdes, très odorantes.
- Elles sont habituellement liquides à température ambiante, très volatiles se qui les différencie des huiles fixes. Leur point d'ébullition varie de 160° à 240°C.
- Elles sont incolores ou jaunes pâles, parfois elles prennent le bleu comme couleur ex : HE d'azulène. Leurs densité est inférieure a celle de l'eau, elle varie de 0.75 à 0.99.
- Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée.
- Elles sont liposolubles, dissolvent les graisses, l'iode, le soufre, le phosphore et réduisent certains sels ; solubles dans l'alcool, l'éther, le chloroforme, les huiles fixes et dans la plupart des solvants organiques usuels, entraînant à la vapeur d'eau très peu solubles dans l'eau à laquelle, toutefois, elles communiquent leur odeur.
- Ce sont des produits stimulants, employés à l'intérieur, comme à l'extérieur du corps, quelquefois purs, généralement en dissolution dans l'alcool ou un solvant adapté (**BRUNETON, 1999 ; BEKHECHI et al., 2010**).
- Elles sont composées de molécules à squelette carboné, le nombre d'atomes de carbone étant compris entre 5 et 22 (le plus souvent 10 ou 15) (**anonyme 3**).

I.3. Localisation et répartition des HE des les plantes

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : fleurs, feuilles, écorces, bois, racines, rhizomes, fruits, graines.

Si tous les organes d'une même espèce peuvent renfermer une huile essentielle, la composition de cette dernière peut varier selon sa localisation.

Quantitativement, les teneurs en HE sont plutôt faibles, assez souvent inférieures à 10 mL/kg.

Les HE sont élaborées au sein du cytoplasme de certaines cellules spécialisées ; elles se séparent par synérèse, et s'accumulent sous la cuticule dans ; les cellules à huiles essentielles des Laureaceae ou des zingiberaceae, les poils glandulaires sécréteurs des Lamiaceae, les poches sécrétrices des Myrtaceae ou des Rutaceae, les canaux sécréteurs des

Apiaceae ou des Asteraceae, qui sont souvent situées sur ou à proximité de la surface de la plante (BRUNETON, 1999 ; BEKHECHI *et al.*, 2010).

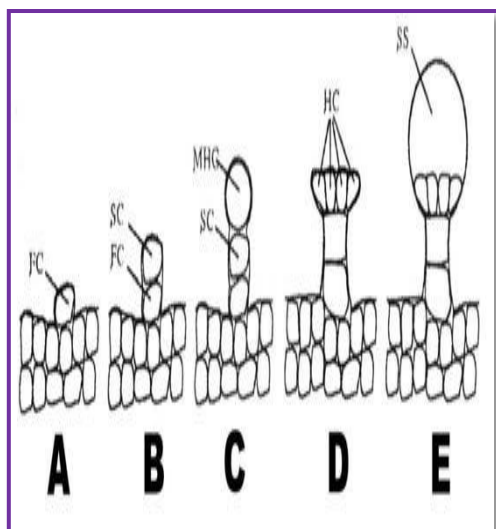


Figure 1 : illustration schémique du développement des glandes productrices d'HE.

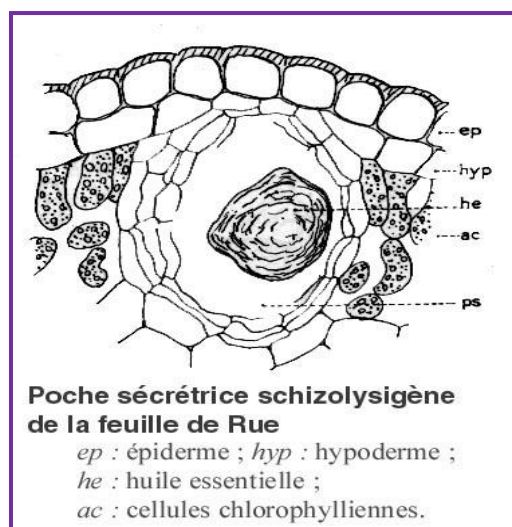


Figure 2: localisation interne d'HE au niveau des cellules sécrétrice

I.4. Rôle des HE dans la plante

Le rôle des huiles essentielles n'a pas pu être clairement démontré. Parfois elles sont considérées comme étant les produits déchets du métabolisme. Ils ont un rôle écologique qui a été déterminé expérimentalement aussi bien dans les interactions végétales comme un agent allélopathique, où leurs sécrétions induisent une augmentation de la production de certains composants pour inhiber la germination en hiver, que dans celui des interactions végétal-animal en protégeant la plante des prédateurs (insectes, champignons, parasite, herbivores) et en favorisant la pollinisation en attirant certains insectes. (MILPIED, 2009 ; BRUNETON, 1999).

Certains auteurs considèrent l'HE comme étant une source énergétique, facilitant certaines réactions chimiques. D'autre part, elle conserve l'humidité nécessaire à la vie des plantes exposées à des climats désertiques. (BEKHECHI *et al.*, 2010).

I.5. Composition chimique des HE

Les huiles essentielles sont constituées de mélanges complexes de composés organiques possédants des structures et des fonctions chimiques très diverses. Ainsi l'analyse instrumentale moderne (CG, CG-SM et SM), a permis d'identifier plusieurs centaines de molécules différentes appartenant principalement à deux grands groupes chimiques ; les hydrocarbures terpéniques (monoterpènes, sesquiterpènes) et les composés aromatiques dérivés de phénylpropane qui sont moins répondus que les précédents **(ROUX et al., 2007)**.

Elles peuvent renfermer aussi divers produits issu de processus dégradatifs mettant en jeu des constituants non volatils. **(BRUNETON, 1999)**

Les constituants jouent du point de vue parfum des rôles d'inégale importance : en grande partie ils contribuent à l'arôme de l'essence, d'autre participent simplement à l'harmonie du mélange. D'autres sont complètement inodores ou peu odorants, ceux-ci ont un rôle tout à fait effacé. **(BEKHECHI et al., 2010)**.

I.5.1. Terpénoïdes

Terpénoïdes sont la plus grande classe de produits naturels avec plus de 40000 structures connues. Certains terpènes sont des éléments clés constituants pour les cellules fonctionnelles (ex : les chaînes de transport d'électrons, composants de la membrane stéroïdiens et les hormones), mais la plupart d'entre eux sont des produits spécialisés qui influent sur l'aptitude de synthétiser les organismes dans les écosystèmes compétitifs. [14]

Dans le cas des HE on ne rencontre que les terpènes les plus volatiles : les monoterpènes et les sesquiterpènes **(BRUNETON, 1999)**.

Les terpénoïdes sont des substances généralement lipophiles qui dérivent d'une entité simples à cinq atomes. **(WILLIAM, 2003)**

La famille des terpènes comprend des hormones, pigments caroténoïdes, stérols latex ainsi qu'une grande partie des HE qui confèrent aux plantes leur parfum ou leur goût. **(WILLIAM, 2003)**

I.5.1.1. Monoterpènes

Constituants les plus simples de série, les monoterpènes sont issus du couplage de deux unités «isopréniques ». Il peuvent être : **acycliques** (myrcène , ocimène) , **monocycliques** (α et γ -terpinene , p-cymène) ou **bicycliques** (pinène , camphène, ocimène). Ils constituent parfois plus de 90% de l'huile essentielle (citrus). Les variations structurales justifient l'existence de nombreuse molécules : alcools (geraniol , α - terpineol , barnéol , trans – franésol) , phénols (thymol) , aldéhydes (citronellal) , cétones (carvone , β - vetivone) , estes (acétate de cédryle) , éthers (1,8 – cinéole) (BEKHECHI et al., 2010).

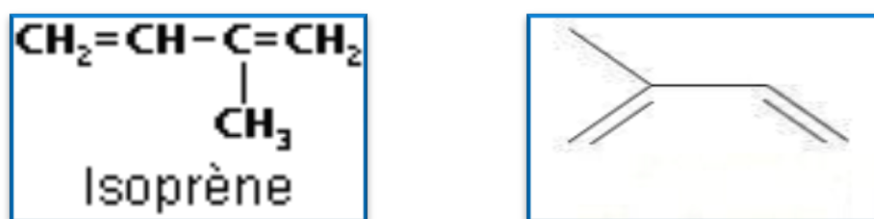


Figure 3: structure et d'un isoprène (BRUNETON, 1999)

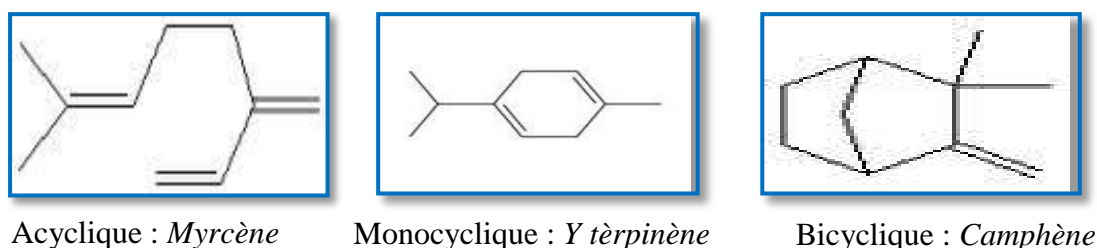


Figure 4 : Exemple de structures des composants monoterpéniques rencontrés dans les HE (BRUNETON, 1999).

I.5.1.2. Sesquiterpènes

Ce sont des hydrocarbures de formule C_{15} , soit une fois et demie (sesqui-) la molécule des terpènes ($C_{10}H_{16}$). (Amina) Un grand nombre de sesquiterpènes sont des constituants habituels des huiles essentielles des végétaux supérieurs, ils peuvent intervenir dans les propriétés pharmacologiques attribuées à ces fractions volatiles (BEKHECHI et al., 2010).

Biologiquement, bon nombre de structures sesquiterpéniques sont des phytoalexines, d'autres semblent agir comme des régulateurs de croissance, d'autres attirent les insectes pour favorisé la pollinisation (BEKHECHI et al., 2010).

Un groupe particulier de sesquiterpènes est représenté par les azulènes composés instables dont le nom vient de leur coloration bleue et qui sont importants en pharmacognosie en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires. Ces composés, non saturés, sont constitués par deux cycles penta et *hepta* carbonés.

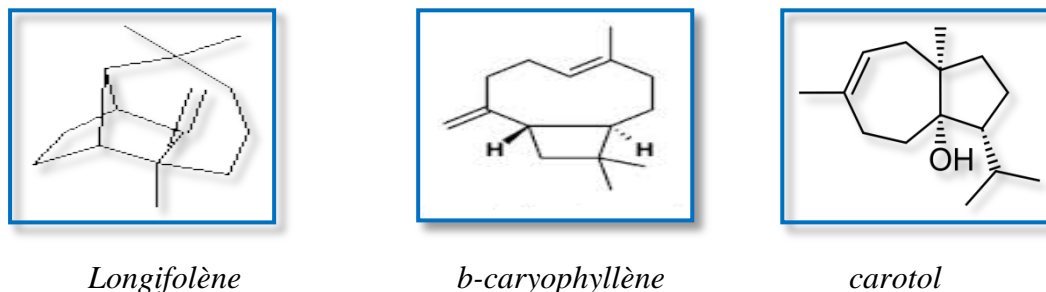


Figure 5: Exemple de structures des composants sesquiterpéniques rencontrées dans les HE (BRUNETON, 1999).

I.5.2. Composés aromatique

Les dérivés du phényl-propane ($C_6 - C_3$) sont beaucoup moins fréquents que les précédents. Ce sont très souvent des allyle – et propényl phénol , parfois des aldéhydes n caractéristiques de certains huiles essentielles d' Apaceae (anis fenouil , persil , etc.... : anéthol anisaldéhyde , apiol , méthyl – chavicol ...) mais aussi de celles de girofle , de la muscade , de l'estragon , de l'acore , des cannelles , etc. on peut également rencontrer dans les huiles essentielles des composés comme la vanilline (assez fréquente) ou comme l'antranilate de méthyle . (Bruneton, 1993).

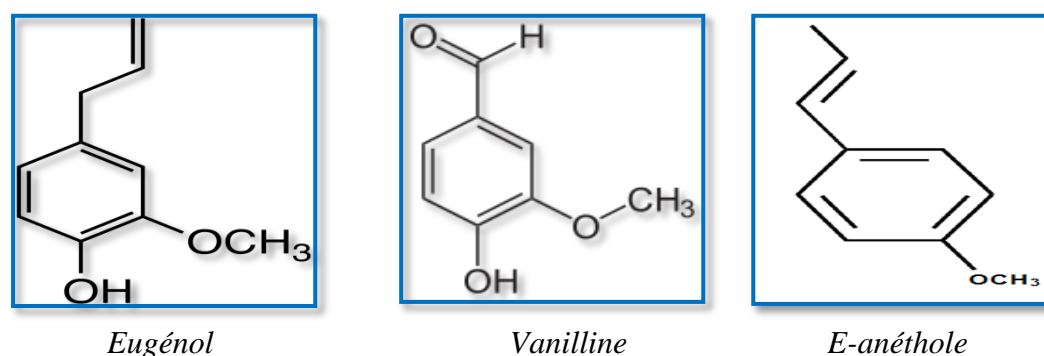
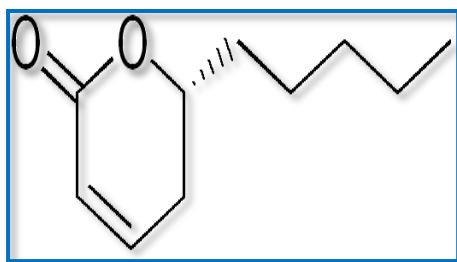


Figure 6 : Exemple de structures des composés aromatique rencontrées dans les HE (BRUNETON, 1999).

I.5.3. Composés d'origine diverses

Ce sont les produits qui résultent de la transformation de molécules non volatiles. Ces composés contribuent souvent aux arômes de fruits. Au cours 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, 1999). Les différents composés sont assez stables aux températures ambiantes.



Massoialactone

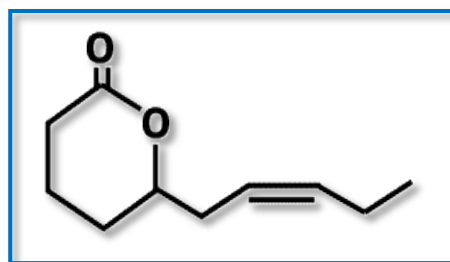
 γ -jasminlactone

Figure 7: Exemple de quelques composés divers rencontrés dans les HE (BRUNETON, 1999).

I.6. Conservation et stockage d'HE :

La relative instabilité des molécules constitutives des HE implique des précautions particulières pour leur conservation. En effet, les possibilités de dégradation sont nombreuses, facilement objectivées par la mesure d'indices chimiques (indice de peroxyde, indice d'acide...), par la détermination de grandeurs physiques (indice de réfraction, pouvoir rotatoire, miscibilité à l'éthanol, densité...) et/ou par l'analyse chromatographique. Les conséquences sont multiples par exemple, photo-isomérisation, photocyclisation, coupure oxydative, peroxydation et décomposition en cétones et alcools, thermo-isomérisation, hydrolyse, transestérification.

Ces dégradations pouvant modifier les propriétés et /ou mettre en cause l'innocuité de l'huile essentielle, il convient de les éviter en utilisant des flacons propres et secs en aluminium vernissé, en acier inoxydable ou en verre teinté anti-actinique, presque entièrement remplis et fermés de façon étanche (l'espace libre étant rempli d'azote ou d'un autre gaz inerte), stockage à l'abri de la chaleur et de la lumière.

Dans certains cas, un antioxydant approprié peut être ajouté à l'huile essentielle. Dans ce cas, cet additif est à mentionner lors de la vente ou l'utilisation de l'huile essentielle.

Par ailleurs, des incompatibilités sérieuses peuvent exister avec certains conditionnements en matières plastiques (**anonyme 3**).

I.7. Toxicité des HE

En dépit de leur image naturelle, les huiles essentielles sont loin d'être non toxique. La majorité des huiles essentielles, ont des doses suffisamment élevées, qui provoque des effets toxiques (**HALLDOR, 2011**).

Cette toxicité varie selon la composition de l'huile essentielles qui elle-même varie selon plusieurs facteurs. (**MILPIED, 2009**)

La toxicité des huiles Essentielles peut être évaluée par des essais de laboratoire tels que les tests de cytotoxicité, où les effets des huiles sur les cellules animales sont examinés, ou in vivo, où les animaux de laboratoire sont exposés à des huiles essentielles et les effets toxiques sont marqués.

Certaines informations peuvent également être extraites de cas où les humains ont montré des effets toxiques après exposition d'huile essentielle. (**HALLDOR, 2011**).

Les HE ont une toxicité aiguë qui est par voie orale faible, ils peuvent causer aussi la neurotoxicité qui induit des crises épileptiformes et tétaniformes, des troubles psychique et sensoriels nécessitant l'hospitalisation (**BRUNETON, 1999**).

Leurs toxicité chronique est assez mal connue, mais en ce qui concerne leur utilisation dans l'aromathérapie et ce quelle que soit la voie d'administration on remarque rarement des éventuels effets secondaires (**BRUNETON, 1999**).

Plusieurs allyl- et propénylphénols sont capable d'induire l'apparition des cancers chez les rongeurs (**BRUNETON, 1999**).

I.8. Domain d'utilisation des HE

I.8.1. En pharmacie

Dans ce domaine généralement les HE sont utiliser sous sa forme naturel soit en infusion (ex : menthe, verveine,...) ou sous forme de préparation galénique simples. ils peuvent avoir a un intérêt médicamenteux (dans le domaines des antiseptique externes), mais généralement, ils sont destinées à l'aromatisation des médicaments destinées à la voie orale.

Les HE constituent un support de la médecine complémentaire : l'aromathérapie **(BRUNETON, 1999)**.

I.8.2. En cosmétologie

L'industrie des cosmétiques et le secteur des produits d'hygiène sont également des consommateurs, même si le coût souvent élevé des produits naturels conduits parfois à privilégier, pour les formulations de grande diffusion, les produits synthétiques **(BRUNETON, 1999)**.

La majorité des cosmétiques contiennent une certaine quantité d'huile essentielle comme élément parfumant, il serait probable que ces essences servent aussi à préserver ces cosmétiques tout en leur assurant une odeur agréable (radia).

A la limite de la pharmacie et des produits d'hygiène, on notera la présence des huiles essentielles dans les préparations pour bains (bains calmants ou relaxants). On notera qu'il y a là une possibilité d'absorption percutanée des constituants terpéniques **(BRUNETON, 1999)**.

I.8.3. Dans les industries agro-alimentaires

L'activité antimicrobienne des extraits des plantes utilisées dans l'assaisonnement des aliments à été reconnue de puis longtemps c'est pour cela, que l'on pense de plus à les utiliser dans la conservation des denrées alimentaires, sans pour autant en dénaturer le goût puisque ces aromates entrent dans la composition des préparations alimentaires **(BEKHCHI et al., 2010)**.

En effet, tous les secteurs alimentaires sont consommateurs : alcools, boissons non alcoolisées, confiserie, produits laitiers, produits carnés, sauces, soupes, produits de boulangerie, sans oublier la nutrition animale (**BRUNETON, 1999**).

Toutefois, quelques limites existent à l'utilisation des huiles essentielles comme agents de conservation dans les aliments, notamment le pouvoir aromatisant de certaines d'entre elles. Cependant des techniques de désaromatisation existent et sont de plus en plus efficaces. D'autre part, les effets organoleptiques indésirables peuvent être limités en sélectionnant soigneusement l'huile essentielle selon le type d'aliment considéré, mais il est important de noter, que dans la plupart des cas, les concentrations d'huiles utilisées sont si faibles, qu'elles ne modifient pas les qualités organoleptiques de l'aliment (**AKKACHE et NOUH, 2012**).

I.8.4. Dans diverses industries

Ils sont utilisés surtout dans les industries chimiques, qui utilisent encore, à coté de produits de synthèse, des isolats (substances pures isolées des huiles essentielles) ces molécules constituent des matières pour la synthèse de principes actifs médicamenteux, de vitamines, de substances odorantes, etc. Ex : utilisation du safrole (extrait d'ocotea brésiliens ou d'espèces de cinnamomun, de chine) pour la synthèse de l'héliotropine utilise en parfumerie ou celle du butoxyde de pipéronyle, un synergiste des pyréthrinoides (**BRUNETON, 1999**).

I.9. Facteurs de variabilité des HE

Plusieurs facteurs influent sur la composition chimique des huiles essentielles on site :

- L'organe producteurs (feuille, racine, fleur,...) d'un organe a un autre on remarque une différence qualitative et par fois quantitative.
- L'origine géographique, botanique, les facteurs environnementales, et les pratiques culturelles (température, humidité relative, la durée d'insolation, regime des vents,...) peuvent influence d'une façon remarquable sur la composition des HE.

- L'influence du cycle végétatif car pour une même espèce la proportion des différents constituants d'une huile essentielle peut varier tout au long du développement.
- L'existence de chimiotypes ou les races chimiques est très fréquents chez les plantes à huiles essentielles.
- L'influence du procédé d'obtention on note parfois que la composition de HE obtenu par hydrodistillation diffère de celle du mélange initialement présent dans les organes sécréteurs du végétal. Au cours de l'hydrodistillation, l'eau, l'acidité et la température peuvent induire une hydrolyse des esters mais aussi des réarrangement, des isomérisation, des oxydation,... (**BRUNETON, 1999 ; BEKHECHI et al., 2010**).

I.10. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles est une opération capitale qui doit permettre d'obtenir des produits volatils, particulièrement fragiles, sans altérer la qualité (**ROUX et al., 2008**).

Il existe plusieurs méthodes d'extraction des huiles essentielles qui diffèrent selon l'utilisation ultérieure de ces derniers ; dans la pharmacopée française par exemple seule l'hydrodistillation ou l'expression à froid qui sont autorisées.

I.10.1. Distillation

La distillation est une opération pharmaceutique qui a pour but de séparer les principes volatils (contenus dans un mélange complexe) de ceux qui ne le sont pas ou le sont moins qu'eux (**DURAFFOURD et al., 2002**).

I.10.1.1. Hydrodistillation

Hydrodistillation est la technique la plus couramment utilisée dans le laboratoire pour l'extraction des huiles essentielles, elle consiste à faire bouillir la matière végétale avec de l'eau dans un ballon, les matières volatiles dans l'échantillon végétal sont entraînés avec la vapeur d'eau, qui est condensée par la circulation de l'eau froide dans un réfrigérant par la suite on recueille cette eau en cours. Généralement pour l'hydrodistillation en utilisant l'appareil de type Clevenger. (**IQBL et al., 2009**).

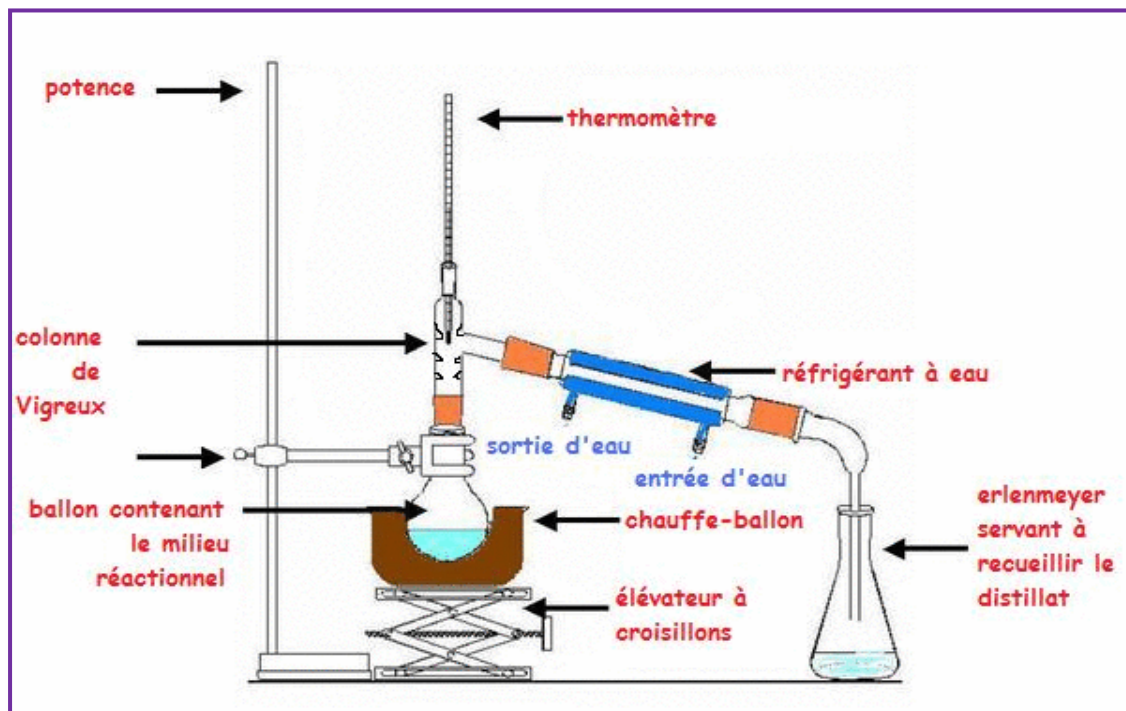


Figure 8: schéma d'un montage d'hydrodistillation ou distillation simple.

I.10.1.2. Entraînement à la vapeur d'eau

Les plantes entières, ou broyées lorsqu'il s'agit d'organes durs (racine, écorce), sont disposées dans un alambic traversé par un courant de vapeur d'eau. Sous l'effet de la chaleur, l'eau se transforme en vapeur qui sous basse pression, traverse alors la cuve remplie de plantes aromatiques. La vapeur d'eau qui a volatilisé et entraîné l'huile essentielle, se condense ensuite dans le serpentin du réfrigérant. La distillation doit être complète pour que l'on récupère tous les constituants aromatiques de l'huile essentielle, ce qui implique souvent une durée relativement longue, variables selon les organes distillés (ROUX *et al.*, 2008).

I.10.1.3. Hydrodiffusion

Le principe de ce nouveau procédé consiste à pulser de la vapeur d'eau à très faible pression à travers la masse végétale, du haut vers le bas à travers le végétal disposé sur une grille à l'intérieur d'un parallélépipède métallique, ce qui permet une meilleure réparation de la charge. L'huile essentielle s'écoule vers un collecteur permettant un équilibrage de pression.

La composition des produits obtenus est qualitativement sensiblement différente de celle des produits obtenus par les méthodes classiques. Le procédé permet un gain de temps et d'énergie (**BEKHECHI et al., 2010**).

I.10.2. Extraction par solvants volatils

Elle consiste à dissoudre les principes aromatiques gras, les pigments, les cires et les résines de la plante fraîche dans un solvant volatil dont l'évaporation laisse un résidu cireux très coloré, très aromatique : **la concrète**. Cette dernière, purifiée par l'alcool absolu, donne : **l'absolue**, qui n'est pas exactement une huile essentielle mais se rapproche beaucoup (**DURAFFOURD et al., 2002**).

I.10.3. Extraction assisté par micro-onde

Extraction par micro-ondes sans solvant (SFME) est une autre technologie verte développée récemment dans lequel une combinaison de chauffage à micro-ondes et la distillation à sec à la pression atmosphérique résultats de l'extraction des huiles essentielles à partir d'échantillons de plantes.

SFME résulte des économies substantielles en temps, en énergie, des solvants et des matières végétales.

L'huile obtenue par extraction à micro-ondes peut être directement utilisées pour l'analyse sans échange de solvant supplémentaire ou élimination de trace d'eau. (**IQBL et al., 2009**).

I.10.4. Extraction par du CO₂ supercritique

Extraction par fluide supercritique, introduit dans les années 1980, utilise le CO₂ sous très haute pression pour extraire les huiles essentielles. Il s'agit d'une énergie efficace, processus respectueux de l'environnement (méthode verte).

Le spécimen de plante est placé dans une cuve en acier inoxydable et le CO₂ est injecté dans le réservoir. Sous haute pression, il se transforme en CO₂ liquide et agit comme un solvant pour extraire l'huile essentielle de la plante. Lorsque la pression est diminuée, CO₂ retourne à l'état gazeux ne laissant que l'huile volatile et aucun autre résidu derrière.

Ces extractions CO₂ à des températures plus basses sont plus douces sur des échantillons de plantes par rapport à distillation à la vapeur, et le résultat en plus

fraîches, huiles propres et plus nettes, qui sentent semblables aux arômes végétaux naturel.

Des études ont montré que l'extraction au CO₂ produit très puissants huiles essentielles avec de bons effets thérapeutiques.

En outre, elle produit des rendements plus élevés, et rend certains matériaux (gommes, résines) plus facile à manipuler. De nombreuses huiles essentielles qui ne peuvent pas être extraites par distillation à la vapeur sont obtenues avec extraction du CO₂. **(IQBL et al., 2009).**

I.10.5. Extraction 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'essences. Ce procédé consiste à broyer, à l'aide de presses, les zestes frais pour détruire les poches afin 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, le produit ainsi obtenu porte le nom d'essence car il n'a subi aucune modification chimique **(ROUX et al., 2008).**

Le domaine d'extraction des huiles essentielles est très vaste et comporte plusieurs procédé et divers méthodes dans : l'enfleurage, extraction à l'eau surchauffée, extraction simultanée,...

II.1. La famille des Apiacées

II.1.1. Généralités

Les apiacées sont une famille qui compte près de 460 genres et 4250 espèces (**JUDD et al., 2002**), présente dans la plupart des régions du globe. Très homogène sur le plan botanique, caractérisée par son inflorescence en ombelle d'où elle tire son appellation ancienne d'ombellifères (Umbelliferae) (**BRUNETON, 2005**). Ces deux caractéristiques d'homogénéité et d'inflorescence en ombelle facilitent sa reconnaissance. Paradoxalement, les espèces de cette famille sont assez difficiles à différencier les unes des autres (**FILLIAT, 2012**).

La majorité des Apiacées sont des plantes aromatiques grâce à leurs sécrétions d'huile essentielle qui contient des composés odorants connus comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthol, l'estragole et bien d'autres (**EL HAIB, 2011**).

Les espèces de cette famille sont fréquemment rencontrées dans la méditerranée où elles sont généralement commercialisées sous forme d'épice ou comme drogue grâce à leurs teneurs en métabolites secondaires (**GHEDDA, 2011**). Leur valeur alimentaire est généralement faible, et leur consommation est justifiée par leurs caractères aromatiques agréables qui est recherchée en cuisine : fruits de carvi, de coriandre, de cumin, feuilles de persil, de cerfeuil, de fenouil ainsi que liquoristerie et confiserie, utilisent les fruits d'anis et tiges d'angéliques, en fin le fenouil qui jusqu'à la fin du siècle dernier, cultivé en France pour la production industrielle d'anéthol (**BRUNETON, 2005**).

Aussi différentes espèces de cette famille sont utilisées comme plantes médicinales pour leurs essences, leurs alcaloïdes ou leurs principes amers (**anonyme 4**), mais parfois elles sont toxiques, elles doivent leur toxicité à des alcaloïdes pipéridiniques, à des carbures acétyléniques polyinsaturés ou à des lactones sesquitérpeniques (cas de *Thapsia garganica*) (**BRUNETON, 2005**).

II.1.2. Description botanique

Appareil végétatif : Les plantes de la famille des Apiacées sont essentiellement des plantes herbacées annuelles, bisannuelles ou le plus souvent vivaces (**FILLIAT, 2012**).

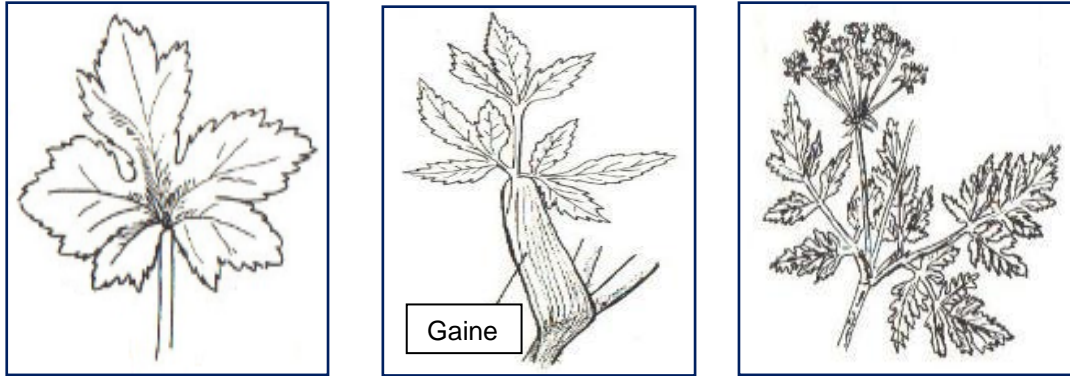


Figure 9: Appareil végétatif des Apiacées

- **L'appareil souterrain:** pérennant est très varié : racine pivotante, rhizome ou tubercule.
- **La tige :** est ordinairement cannelée et creuse par résorption précoce de la moelle au cours de la croissance ; elle est dite fistuleuse (**FILLIAT, 2012**). Ces canaux sécréteurs contiennent des huiles essentielles et des résines, des saponines triterpéniques, et des coumarines, des polyacétylènes faltarinones, des monoterpènes et des sesquiterpènes (**FILLIAT, 2012 ; JUDD et al., 2002**).
- **Les feuilles:** sont alternes, composées pennés ou palmées, profondément découpées ou lobées, entières ou dentées serrées. La nervation étant pennée à palmées ; à pétioles plus ou moins engainants, stipulées ou exstipulées. On parle de feuille pennatiséquée. (**JUDD et al., 2002**),
- **Appareil reproducteur des Apiacées :** L'inflorescence est la partie la plus importante de la plante car c'est grâce à elle que la famille des Apiacées est facilement reconnue.

Les fleurs sont en effet groupées en ombelles simples et le plus souvent, en ombelles composées, généralement blanches et plus rarement jaunâtres, verdâtres ou rosées. Généralement hermaphrodites mais parfois unisexuées (monoïque ou dioïque).

Leurs dispositions en inflorescences relativement condensées expliquent qu'elles soient généralement de petite taille. Leur simplicité et leur régularité caractérisent les Apiacées ; ainsi, la fleur a toujours la même formule florale: $5S + 5P + 5E + 2CS$ sépales qui sont libres et très réduits. P: pétales, libres mais se développent sur un primordium annulaire, parfois nettement soudés. E : étamines, parfois nombreuses à filets libres, grains de pollen tricolporés. C : carpelles, soudés, ovaires infères.

Les différentes formes du fruit ainsi que la présence ou l'absence de bandelettes, leur nombre, leur évolution sont autant de critères permettant la classification des différentes espèces au sein de cette famille (**FILLIAT, 2012 ; JUDD et al., 2002**).

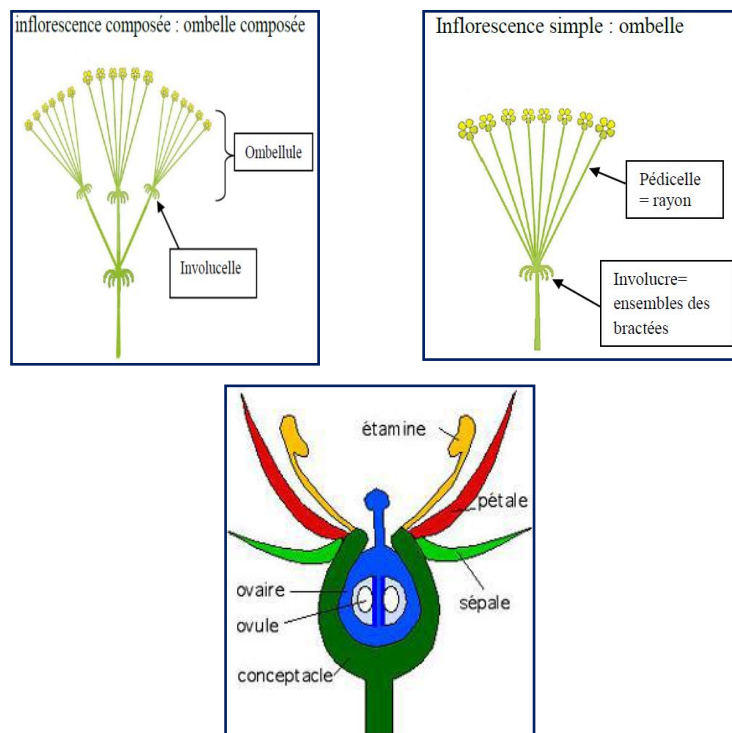


Figure 10: Inflorescence et appareil reproducteur des Apiacées. (**FILLIAT, 2012**).

II.2. Généralités sur le genre *thapsia*

Ce genre appartient à la famille des apiacées avec des plantes vivaces, en général élevées, avec des feuilles 2-3 pinnatiséquées très velues sur les 2 faces, grisâtres en dessous, à lobes larges et courts. Involucre et involucre nuls. Souches fistuleuses. Fleurs blanches ou jaunes. Fruits à marges fortement ailées. Méricarpes de 10-12 X 8 mm, à 2 ailes pas plus larges que le méricarpe. Les ailes latérales seules développées, les dorsales nulles. Méricarpes plans sur la face interne. Pelouses, forêts claires. Assez commun dans l'Algérie (**QUEZEL et SANTA 1962**).

II.3. *Thapsia garganica* L

II.3.1. Etymologie : *Thapsia garganica* (Thapsia en Français, Aderyis en Kabyle, Bounafaa en Arabe) est une plante poussant spontanément. Elle est connue pour sa toxicité, et son effet irritant sur la peau . (**NEGRE, 1962**).

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, promontoire italien sur l'adriatique, où elle se rencontrait communément jadis (**BENISTON, 1984**).

II.3.2. Classification botanique

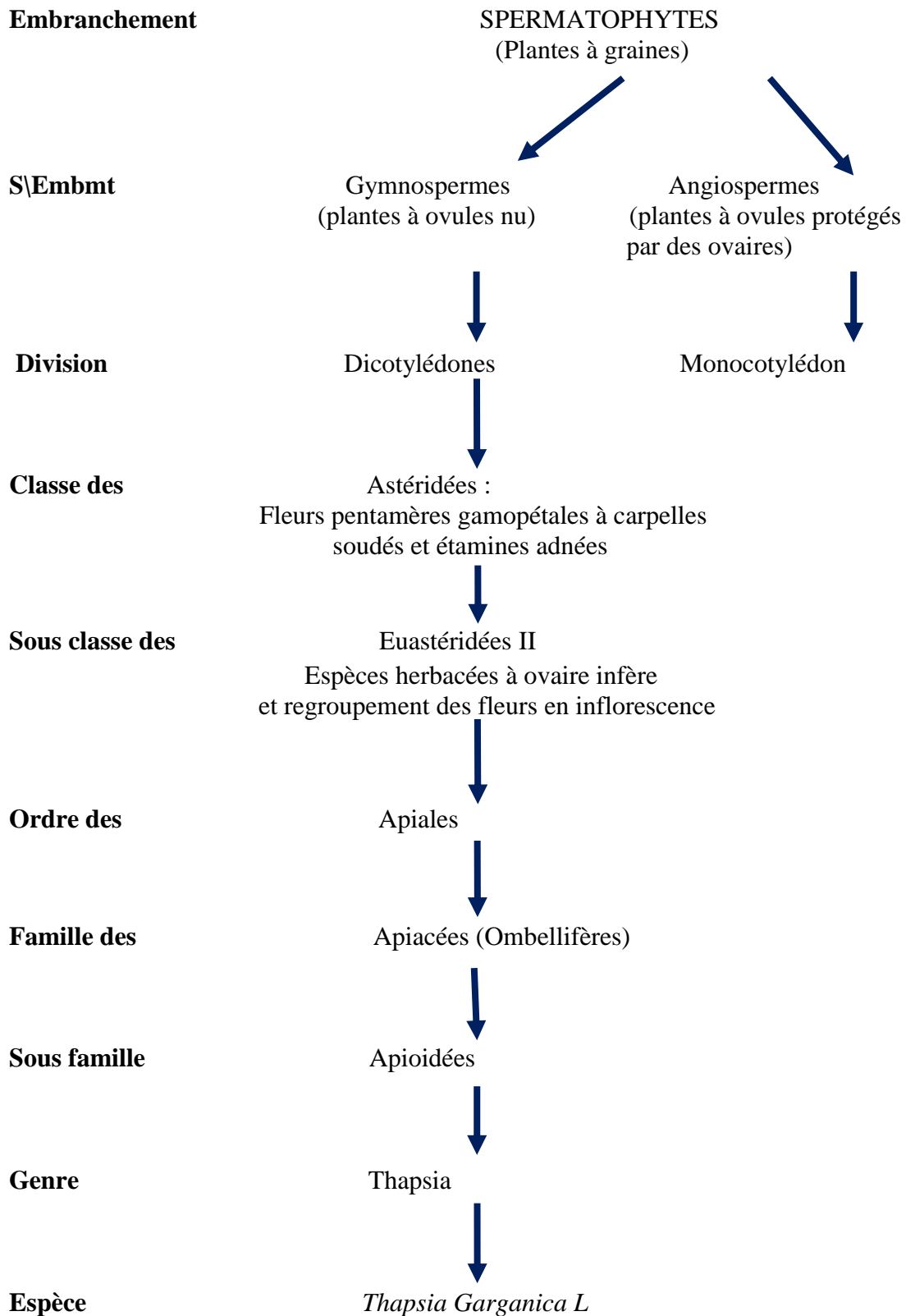


Figure 11 : classification botanique de *thapsia garganica* L (FILLIAT, 2012).

II.3.3. Propriétés

C'est une plante vivace, généralement confondue avec *thapsia villosa* L., très commune en Afrique du Nord, au Maroc, et en Libye, comme elle est rencontrée aussi en Asie Mineure (France exceptée). Elle n'est pas aussi xérophyle que les autres ombellifères, elle vit donc partout dans notre domaine, et ça grâce à son inaffinité édaphique spéciale, mais elle est abondante surtout dans les endroits rocailloux (**anonyme 4 ; NEGRE, 1962**).

Plante toxique qui supporte le pâturage et qui pousse dans les terrains lourds du Tell et dont la culture principale est l'olivier (**AOUADI ; PARIS et al., 1981**).

Cette plante fait partie de la liste des plantes médicinales utilisée traditionnellement en état ou sous forme de préparation dont les effets indésirables potentiels sont supérieurs aux bénéfices thérapeutiques attendus (**anonyme 5**).

II.3.4. Description

Tige : elle est constituée d'une hampe florale et de feuilles espacées. Glabre, épaisse, plus ou moins creuse, entourée de poils raide à la base (**NEGRE, 1962 ; PARIS, 1981**).



Feuilles : les feuilles de cette espèce sont séparées, dont les inférieures à pétiole largement gainé à la base, puis se réduisant peu à peu à la gaine dans les feuilles supérieures, limbe au moins 2-3 pennatiséqués, à divisions allongées étroites (au plus 1 x 6 cm), velu de poils blanc sur: les rachis, la face supérieure, les marges et les nervures inférieures (**NEGRE, 1962**).



Fruit: de 13-28 x 10-16 mm, à côtes dorsales visibles mais non ailées, au contraire des latérales qui sont aiguës au sommet, un peu déprimées à la base et garnies d'une aile très large, brillante (NEGRE, 1962).



Fleur : Ombelles bractioléolées par une feuille le plus souvent réduite à la gaine, involucre nul ou réduit à de petites pièces informes et vite caduques, rayons souvent un peu renflés à la base. Fleurs d'un beau jaune à calice glabre, terminé par de petits lobes, à gros pétales oblongs, étalés, un peu dépassés par le filet des étamines (NEGRE, 1962). L'inflorescence de cette plante aura lieu entre le mois d'Avril et juillet (BENISTON, 1984).



Racine : cette plante possède une grosse racine cylindrique marquée de stries annulaire, renferme un suc âcre et caustique (PARIS et al., 1981).



Figure 12: photographies des différentes parties de *Thapsia garganica* L ; a) tige, b) feuilles, c) fruit, d) fleur, e) racine.

II.3.5. Utilisation

Thapsia garganica L est une plante médicinale très célèbre surtout connue pour son effet thérapeutique telles que: diurétique, émétique et purgatif. Une résine est extraite avec de l'alcool à partir de l'écorce de la racine. La plante a été considérée comme spécifique dans le traitement de la douleur, mais la prudence est recommandée car elle est toxique pour certains mammifères. Dans la présente étude, nous avons entrepris une nouvelle enquête sur la teneur en huile essentielle de la plante soupçonnés d'avoir un effet important bioactif avec les autres constituants (**HAMEURLAINE et al., 2011**).

La plante est utilisée pour combattre la toux et les bronchites rebelles ainsi que les rhumatismes, la rage et la stérilité féminine. On l'utilise aussi, mélangé à de la farine et à du son, en cataplasmes beaux, contre les morsures d'animaux venimeux ou enragés (**25**).

En certains lieux de la Kabylie, le premier jour du printemps est solennisé par une préparation d'un plat cuisinier : couscous aux œufs durs et aux fèves cuit à la vapeur d'une décoction de racines de thapsia, mets savoureux en même temps que médication salubre et qui a la propriété d'être légèrement enivrant et purgatif (**GENEVOIS, 1975**).

Les femmes qui désirent être bien en chair, élément traditionnel de la beauté féminine, mangeront, passées à la poêle, une petite quantité des racines de thapsia qui ont servi à communiquer au couscous ses propriétés curatives ou purgatives (**GENEVOIS, 1975**).

II.3.6. Toxicité

Cette plante qui est classée parmi les plantes toxiques (**QUEZEL et SANTA, 1962 ; anonyme 4**), elle est fortement rubéfiante, produisant des cloques et des démangeaisons intenses (**HAMEURLAINE et al., 2011 ; GHEDDA, 2011**).

La plante entière peut être considérée comme poison pour les troupeaux ce qui limite leurs déplacements en Cyrénaïque (**anonyme 4**).

Une étude précédente s'est intéressé à la toxicité de *Thapsia garganica* récolté dans la région de la Kabylie en Algérie au moment de la floraison, ou différentes parties de la plante à savoir feuilles, fleurs et racines on permis de préparer une infusion à fin de l'injecter à des souris de laboratoire (**BEDJOU et al., 2011 ; BEDJOU, 2010**).

Quelques heures après l'ingestion de celle-ci par les souris certains paramètres sanguins ont été estimés, à savoir des enzymes hépatiques telles que : la transaminase glutamique oxaloacétique (TGO), la transaminase glutamate pyruvate(TGP) ; la phosphatase alcaline, des paramètres sanguins telles que l'urée, la créatine, la bilirubine totale, la bilirubine directe et indirecte. Les résultats montrent une toxicité des différentes parties de la plante ce qui se traduit par : une TGP de 47.6 UI pour la racine, 44 UI pour les feuilles et 41.1 UI pour les fleurs. Alors que la TGO a révélé les valeurs de 113.8 UI pour la racine, 133 UI pour les feuilles et 118 pour les fleurs (**BEDJOU et al., 2011 ; BEDJOU, 2010**).

II.3.7. Les métabolites secondaires

Les êtres vivants produisent un grand nombre et une grande variété de métabolites secondaires, qui peuvent jouer différents rôles écologiques, y compris la défense contre les prédateurs, la prévention de la prolifération (**BICKMEYER, 2010**).

II.3.7.1. Les composés terpéniques.

Une enquête sur la composition chimique de cette espèce a délivrée une série de di-lactones tétra-cycliques C-19, dont la production dépend de la date et le lieu de la collecte. Son principal constitutif est thapsigargine (figure 14) du groupe guaianolide (**APPENDINO et al., 2005**).

Dans une collection de racines en Sardaigne en été (fin Juin) apparait un composé supplémentaire qui a été caractérisé comme un inhabituel dilactone C-19 (figure 16), une autre collection dans un hiver loin et dans le même endroit apparait trois autres composés supplémentaires (figure 15) qu'ils étaient absents dans la collection d'été. L'identification de ces composés a montré qu'ils sont des lactones sesquiterpéniques (**J.Nat.Prod, 2005**) ; et des efforts récents ont conduit à l'isolement de deux nouveaux composés (figure 14).

Malgré le manque de similarité structurale avec TG, les composés 4-7 (figure 15) ont la capacité de réguler l'homéostasie Ca^{2+} in vivo: l'action principale d'inhibiteurs de SERCA-ATPase comme TG (figure 13) (HOSEA et al., 2007).

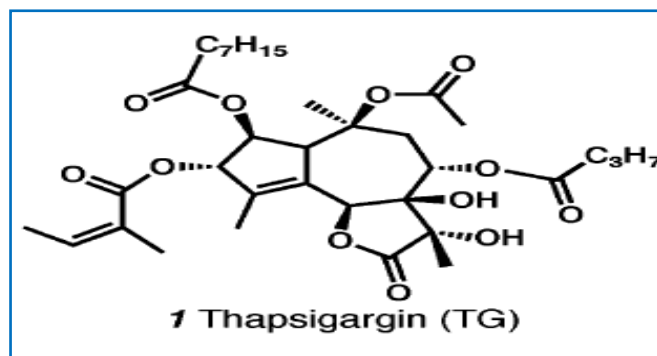


Figure 13: structure du squelette de thapsigargin de *Thapsia garganica* L (HOSEA et al., 2007).

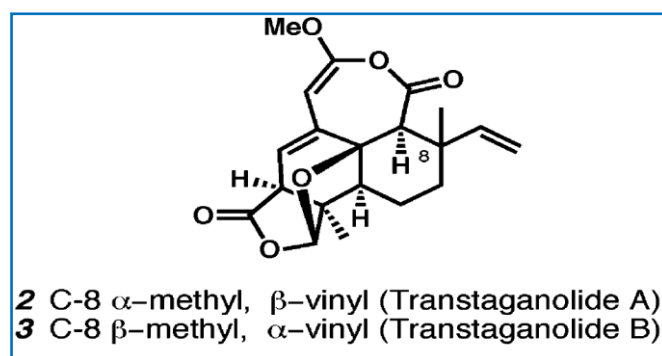


Figure 14: structure des transtaganolides A et B de *Thapsia garganica* L (HOSEA et al., 2007).

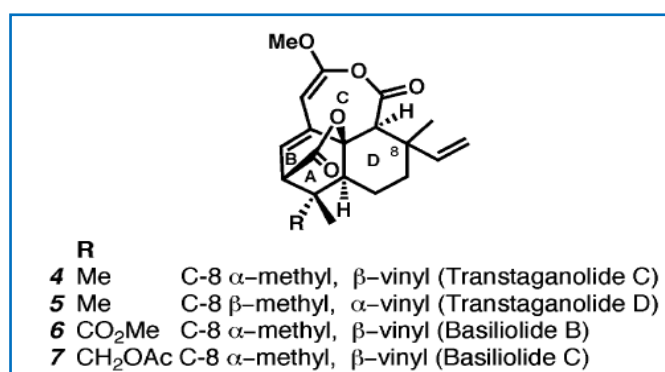


Figure 15: structure des lactones sesquiterpéniques de *Thapsia garganica* L (HOSEA et al., 2007).

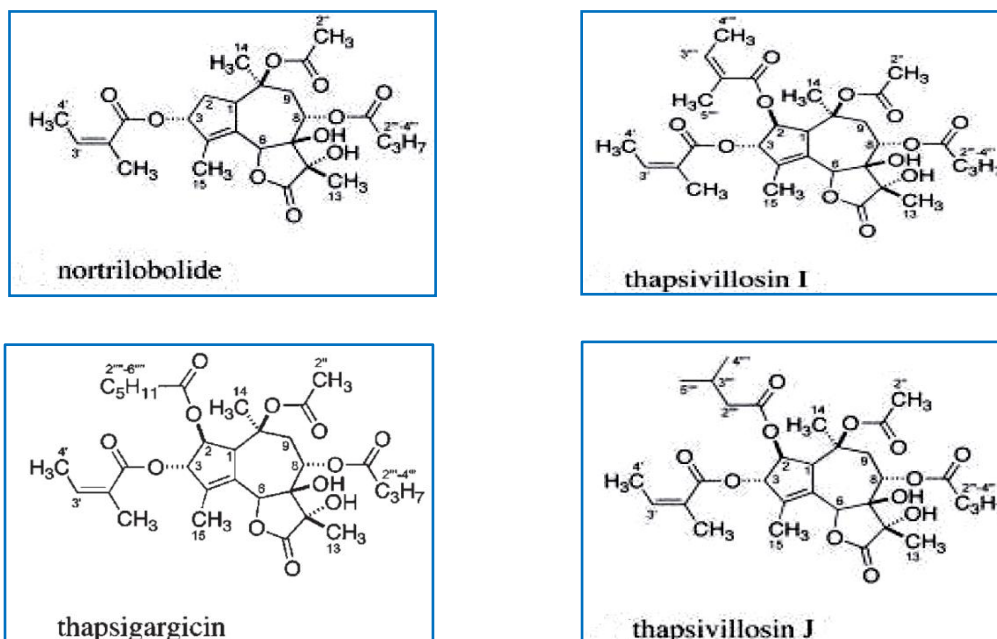


Figure 16: structure des autres lactones sesquiterpéniques de *Thapsia garganica* L (LAMBERT, 2007).

II.3.7.2. Les Composés phénoliques

Les composés phénoliques sont très diversifiés dans les végétaux (8000 molécules connues) [20], ils possèdent tous un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. Leur classification est basée sur la complexité du squelette de base (allant d'un simple C₆ à des formes très polymérisées), le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, degré d'hydroxylation, de méthylation...) et par les liaisons possible de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines...) (MACHEIX, 2005).

Les phénylpropanoïdes ou les acides hydrocinnamiques représentent une classe très importante dont la structure de base (C₆-C₃) dérive de celle de l'acide cinnamique, leurs réactivités chimiques dépend du degré d'hydroxylation du cycle benzénique et par des modifications par des réactions secondaires (ex: méthylation) (MACHEIX, 2005).

Ces métabolites secondaires ont un rôle antioxydant protecteur pour les végétaux contre les agressions de l'environnement (température, lumière) ou de pathogène. Ils assurent d'ailleurs aussi ce rôle dans le corps humain (MEHINAGIC, 2011).

Les phénylpropanoïdes de *thapsia garganica* (1A, 2A, 3A, 4A), isolés dans une étude sur la cytotoxicité de cette plante, sont tous des esters de 1-méthyl-2-(3,4-méthylènedioxy-5-méthoxyphényl)-2-hydroxyéthyle 2,3-dihydroxy-2-méthylbutanoïque. Leurs identifications montrent que ces acyles sont : angeloyl (1A), octanoyl (2A), hexa-noyl (3A), et butanoyl (4A) qui sont connus sous le nom de neohelmanthicine A, B, C et D (**HUIZHEN, 2006**).

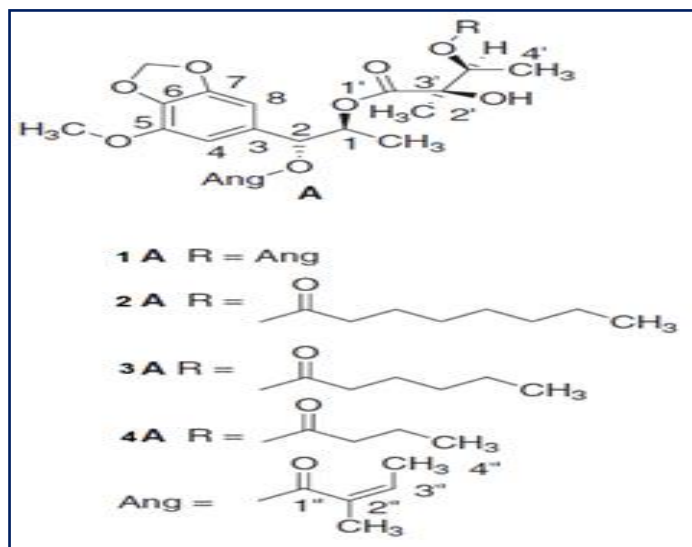


Figure 17: Les phénylpropanoïdes de *thapsia garganica* L (**HUIZHEN, 2006**).

II.3.8. Les lipides de *Thapsia garganica* L

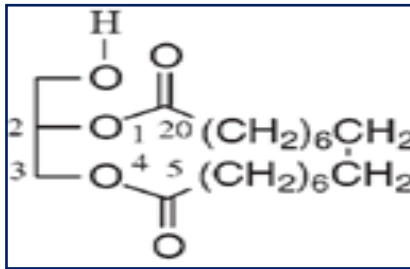
Les lipides de TG sont des lipides captifs sans précédent dans le règne végétal, isolés à partir des fruits de cette plante qu'il été en moi de juillet 2002 (**HUIZHEN, 2004**).

Ces lipides captifs sont spécifiques par le fait que deux des atomes d'oxygène de glycérol sont inclus dans un anneau macrocyclique. Ces composés ont des effets prononcés sur les membranes des cellules offrant la modulation de l'activité des enzymes telles que la protéine kinases et des phospholipases. Ces propriétés ont encouragé la synthèse et le teste d'un certain nombre de ces lipides (**HUIZHEN, 2004**).

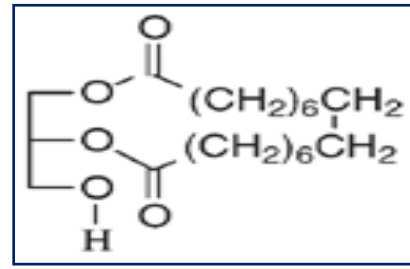
Les lipides captifs n'ont jamais été trouvés dans la nature à l'exception d'archéobactéries, par exemple, *Methanos pirillum hangatei*.

On suppose que la présence d'éthers de glycérol terpénoïdes dans la membrane permet aux bactéries de se développer dans des environnements hostiles (**HUIZHEN, 2004**).

Les deux lipides macrocycliques 2-hydroxy-méthyl-1, 4 -dioxacycloicosane-5 ,20-dione (1) et de 3-hydroxy-1 ,5-dioxacyclohenicosane-6,21-dione (2) qui ont une formule moléculaire de $C_{19}H_{34}O_5$ (**HUIZHEN, 2004**).



Le composé 1



Le composé 2

Figure 18 : exemple de structure des lipides de *thapsia garganica* L.

II.3.9. Thasigargine

La thasigargine guaianolide c'est une lactone sesquiterpène, composé majoritaire de *thapsia garganica*, elle est devenue un outil indispensable dans l'étude de la physiologie cellulaire et dans l'étude du calcium homéostasique, elle se présente en faible quantité dont environ 0,1 % de Thasigargine sont extraits des racines. (**BICKMEYER, 2005**).

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

Thasigargine se fixe sur les récepteurs des mastocytes favorisant la formation et la sécrétion de l'histamine qui est un vasodilatateur puissant qui augmente la perméabilité capillaire, signe d'une réponse inflammatoire. Préformé, sécrété

essentiellement par les mastocytes, polynucléaires, basophiles et les plaquettes en réponse à plusieurs stimulus parmi eux cette thapsigargine, ce qui explique les réactions inflammatoires observées sur la peau causées par cette plante. Un effet similaire a été observé avec la thapsigarginine, mais n'étant pas autant efficace (HOSEA, 2007).

La thapsigargine est cytotoxique sur les cellules en faible prolifération, et c'est donc le cas des cellules hormono-indépendantes du cancer de la prostate, c'est le contraire des molécules anticancéreuses qui cible les cellules en forte prolifération, cas des cellules cancéreuses. Une étude comparative de la Tg avec la doxorubicine et le taxol dont les cytotoxicités sont proches, mais dont l'action est sélective a donné les résultats présentés dans la figure 19.

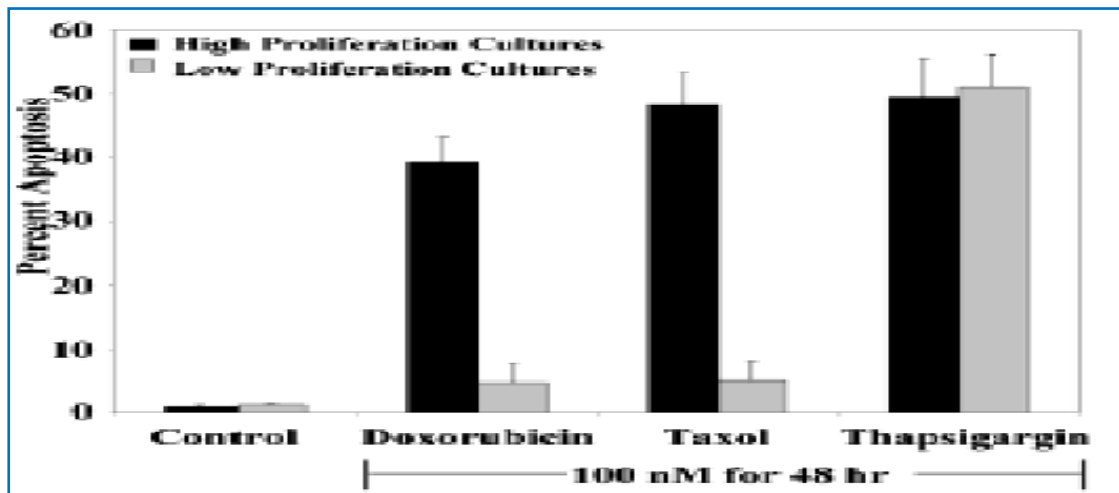


Figure 19: Cytotoxicité comparée de la Tg sur plusieurs souches cellulaires.

Grace à l'apoptose provoquée, la thapsigargine peut être utilisée dans un traitement de ce cancer, il faut pouvoir la cibler près de la prostate, sans quoi elle tuerait aussi les cellules saines (MACÉ, 2006).

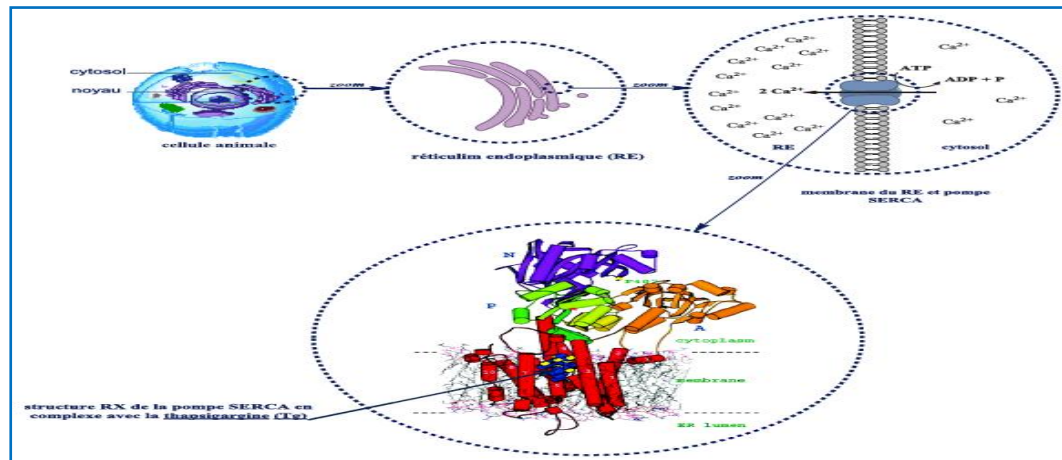


Figure 20: localisation des pompes SERCA.

III.1. Activités biologiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont connues pour être douées de propriétés antiseptiques et antimicrobiennes. Beaucoup d'entre elles, ont des propriétés antitoxiques, antivenimeuses, antivirales, antioxydantes, et antiparasitaires. Plus récemment, on leur reconnaît également des propriétés anticancéreuses (**VALNET, 2005**).

L'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique et les possibles effets synergiques entre ses composants. Sa valeur tient à son «totum» ; c'est-à-dire, l'intégralité de ses constituants et non seulement à ses composés majoritaires (**LAHLOU, 2004**).

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

III.1.1. Activité antioxydante

Le pouvoir antioxydant de ces huiles est développé comme substitut dans la conservation alimentaire. Ce sont surtout les phénols et les polyphénols qui sont responsables de ce pouvoir (**RICHARD, 1992**).

Lorsque l'on parle d'activité antioxydante, on distingue deux sortes selon le niveau de leur action : une activité primaire et une activité préventive (indirecte). Les composés qui ont une activité primaire sont interrompus dans la chaîne autocatalytique de l'oxydation (Multon, 2002). En revanche, les composés qui ont une activité préventive sont capables de retarder l'oxydation par des mécanismes indirects tels que la complexation des ions métalliques ou la réduction d'oxygène... etc. (**MADHAVI et al. 1996**).

Des études de l'équipe constituant le Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) de l'INRS-IAF, ont montré que l'incorporation des huiles essentielles directement dans les aliments (viandes hachées, légumes hachés, purées de fruit, yaourts...) où l'application par vaporisation en surface de l'aliment (pièce de viande, charcuterie, poulet, fruits et légumes entiers...) contribuent à préserver l'aliment de phénomènes d'oxydation (**CAILLET et LACROIX, 2007**).

III.1.2. Activité antibactérienne

Du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants des HE, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire (**CARSON et al. 2002**).

De façon générale, il a été observé une diversité d'actions toxiques des HE sur les bactéries comme la perturbation de la membrane cytoplasmique, la perturbation de la force motrice de proton, fuite d'électron et la coagulation du contenu protéique des cellules (**Davidson, 1997**).

Le mode d'action des HE dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane (**COX et al. 2000; CARSON et al. 2002**).

Une inhibition de la décarboxylation des acides aminés chez *Enterobacter aerogenes* a aussi été rapportée (Wendakoon et Sakaguchi, 1995). Les HE peuvent aussi inhiber la synthèse de DNA, ARN, des protéines et des polysaccharides (**COX et al. 1991**).

Néanmoins, certains composés phénoliques de bas poids moléculaire comme le thymol et le carvacrol peuvent adhérer à ces bactéries par fixation aux protéines et aux lipopolysaccharides pariétales grâce à leurs groupes fonctionnels et atteindre ainsi la membrane intérieure plus vulnérable (**DORMAN et DEANS, 2000**).

III.1.3. Activité antifongique

Dans le domaine phytosanitaire et agro alimentaire, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant la denrée alimentaire (**LIS BALCHIM, 2002**).

Les huiles essentielles les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antifongiques appartiennent à la famille des Labiatae : thym, origan, lavande, menthe, romarin, sauge, etc.

Étant donnée la grande complexité de la composition chémotypique des huiles essentielles, malgré de possibles synergies certains auteurs préfèrent étudier l'effet d'un composé isolé pour pouvoir ensuite le comparer à l'activité globale de l'huile. Ainsi l'activité fongistatique des composés aromatiques semble être liée à la présence de certaines fonctions chimiques (Voukou et al., 1988). Ils concluent que les phénols (eugénol, chavicol 4-allyl-2-6 diméthoxyphénol) sont plus antifongiques et que les aldéhydes testés (cinnamique et hydro cinnamique). Ils présentent également des propriétés fongistatiques très marquées. Les groupements méthoxy, à l'inverse, ne semblent pas apporter à ce type de molécules une fongitoxicité significative.

Cette activité est estimée selon la durée d'inhibition de la croissance déterminée par simple observation macroscopique. L'activité antifongique décroît selon le type de fonction chimique: Phénols> Alcools> Aldéhydes> Cétones> Ethers> Hydrocarbures.

Parmi les aldéhydes aliphatiques, le cinnamaldéhyde s'est révélé le plus actif. En ce qui concerne les composés phénoliques, l'activité antifongique augmente avec l'encombrement stérique de la molécule (p-n-propylphénol> thymol> isoeugénol> eugénol) (**ULTREE et al. 2002**).

L'addition de groupements alkyls au noyau benzène du phénol augmente le caractère antifongique. Par conséquent, un certain degré d'hydrophobicité des composés phénoliques ou aldéhydes aromatiques paraît donc requis pour exprimer une caractéristique antifongique optimale. L'activité des terpènes des huiles essentielles est en corrélation avec leur fonction chimique. Les travaux de **ChAO et al. (2000)**,

ont montré l'importance de la spécification du genre et de l'espèce, ainsi que de la variété de la plante d'où provient l'extrait.

III.2. histopathologique du foie

On qualifie le toxique un composé qui peut nuire à la santé des organismes vivants, en particulier à celle des êtres humains (**GLOMOT, 1986 ; REICHEL et al ., 2004**).

L'effet d'un toxique dépend toujours de l'espèce et de la dose, selon leur origine, on distingue les toxiques synthétiques et les toxiques naturels (toxine) provenant des microorganismes, des animaux ou des plantes (**REICHEL et al ., 2004**)

Les tests « in vivo » ne sont pas les seuls qui doivent être réalisés pour l'évaluation des effets toxiques d'une substance. De nombreux autres aspects pharmacotoxicologiques doivent être abordés pour déceler un impact éventuel :

- Effet sur le foie
- Effet sur les reins
- Effet sur la peau
- Effet sur l'oeil (**GLOMOT, 1986**).

III.2.1. Hépatotoxicité

III.2.1.1. Physiologie et anatomie du foie

Le foie est l'organe le plus volumineux et le plus complexe du corps, il est impliqué dans le métabolisme des nutriments et de la plupart des xenobiotiques, ces derniers sont généralement

detoxifiés, mais certains sont bioactives et deviennent plus toxiques (**FRANK, 1996**).

Ses principales fonctions peuvent se résumer ainsi :

- ❖ Métabolisme des graisses :
 - Oxydation des triglycérides pour produire de l'énergie.
 - Synthèse de lipoprotéines plasmatiques
 - Synthèse du cholestérol et de phospholipides
 - Métabolisme des hydrates de carbone :

- Conversion des hydrates de carbone et des protéines en acides gras en triglycérides.
- Régulation de la glycémie par les processus de glycogénèse, glycogénolyse et néoglucogénèse.
- ❖ Métabolisme protéique
 - Synthèse de protéines plasmatique, incluant l'albumine et les facteurs de coagulation.
 - Synthèse d'acides aminés non essentiels.
 - Détoxification des déchets métaboliques.
 - Stockage de glycogène, de vitamine et de fer
- ❖ Métabolisme intermédiaire :
 - Détoxification de médicaments et toxiques variés, comme l'alcool
 - Sécrétion
 - Synthèse et sécrétion de la bile, cette dernière contient de nombreuses produits, résultant des processus précédents (**HORN et al., 2005 ; YOUNG et al., 2008**).

La principale cellule fonctionnelle du foie est une forme de cellule épithéliale appelée hépatocyte. Les hépatocytes sont séparées par des fines sinusoides vasculaires à travers lesquels circule le sang.

Le foie présente donc la particularité d'être irrigué à la fois par du sang artériel et veineux et d'être drainé par un système veineux distinct.

Après son passage dans les sinusoides, le sang gagne la veine cave inférieure par l'intermédiaire de la veine sus-hépatique

Les vaisseaux sanguins et canaux les plus volumineux cheminent dans le foie à l'intérieur d'un réseau ramifié de nature collagène formant les espaces portes. Ces espaces contiennent également les canaux biliaires qui transportent les biles vers l'intestin grêle où elle est sécrétée (**HORN et al., 2005 ; YOUNG et al., 2008**).

III.2.1.2. Principales lésions hépatiques

Le foie est le site principal des biotransformations des xénobiotiques ; toute affection hépatique (stéatose, cirrhose, nécrose), en modifie le métabolisme et par voie de conséquence, la toxicité (VIALA, 2007).

III.2.1.2.1. Stéatose :

Il s'agit d'une accumulation excessive de graisse dans le foie, qui contient plus de 5% de lipides (en poids). La présence d'un excès de lipides qui peut être visualisée histochimiquement. L'accumulation de lipides dans le foie est la phase finale commune à tous les toxiques, le plus fréquent étant probablement le blocage de la libération des triglycérides hépatiques dans le plasma.

Les triglycérides hépatiques étant sécrétées seulement après combinaison avec des lipoprotéines (formation de lipoprotéines à basse densité Very Low Density Lipoprotein ; VLDL), l'accumulation des lipides hépatiques peut être la conséquence de plusieurs mécanismes :

- Inhibition de la synthèse de la moitié protéique des lipoprotéines
- Perte de Potassium par les hépatocytes, interférence avec le transport des VLDL à travers la membrane cellulaire.
- Diminution de l'oxydation des lipides par les mitochondries.
- Inhibition de la synthèse des phospholipides, constituants essentielle des VLDL (FRANK, 1992).

III.2.1.2.2. Nécrose hépatique :

La nécrose hépatique implique la mort des hépatocytes qui se produit par la rupture de la membrane plasmique. Les modifications morphologiques précoces sont caractérisées par des oedèmes cytoplasmiques, le gonflement du réticulum endoplasmiques et la désagrégation des polysomes, puis l'accumulation de triglycérides sous forme des gouttelettes lipidiques dans les cellules.

Les changements biochimiques sont complexes, le toxique se lie de façon covalente avec des protéines et des lipides insaturés et induit une peroxydation lipidique, les membranes cellulaires, riches en lipides insaturés sont très sensibles à ces altérations qui peuvent être la cause de leur rupture (FRANK, 1992).

III.2.1.2.3. Cirrhose :

La cirrhose caractérisée par une destruction répétée des hépatocytes, et donc par la présence d'infiltration de collagène dans la masse hépatique, séparées par les couches fibreuses, les amas d'hépatocytes apparaissent sous forme de nodules.

Dans la cirrhose, les hépatocytes séparées d'un courant sanguin sinusoïdal normal, ont une fonction réduite, par exemple synthétisent moins d'albumine et sécrètent moins de bile. Le sang provenant de la veine porte n'est plus drainé hors du foie et une hypertension portale se développe (**FRANK, 1992 ; YOUNG, 2008**).

III.2.1.3. Procédures d'évaluation

Le produit à tester devrait être administré à l'animal par la même voie que l'exposition humaine prévisible.

Examens

- **Examens macroscopiques**

La couleur et l'aspect peuvent souvent indiquer la nature de la toxicité, ainsi que le poids du foie et dans certains cas l'indice le plus sensible de la toxicité. (**FRANK, 1992**).

- **Examens microscopiques**

La microscopie optique peut détecter de nombreuses anomalies histologiques, comme des changements de teneur lipidique, des nécroses, des cirrhoses, des nodules hyperplasiques et des néoplasmes. La microscopie électronique peut détecter les modifications de diverses structures subcellulaires, souvent utiles pour déterminer le mode d'action des toxiques (**FRANK, 1992**).

Matériel et méthodes

1. Objectif du travail :

Thapsia garganica L est une espèce répandu en Algérie, utilisée en médecine traditionnelle (GOMEZ, 2007). Cette plante est consommé qu'une fois par an (le premier jour du printemps). L'ingéniosité des pratiquant exige l'utilisation de la fraction volatile des racines et interdisent l'utilisation de l'extraits aqueux ou n'importe qu'elle autre fraction de la partie aérienne. Dans le but de comprendre le choix de cette période, de cette partie et de cette fraction pour sa consommation, une étude comparative de l'activité antioxydante et antimicrobienne ainsi que la toxicité de ses huiles essentielles et ses extraits phénoliques est entamé pour les différentes parties aériennes et souterraines et pour les récolte de 17 Janvier, 17 Février, 17 Mars, 21 Mars et 25 Mars dans la région du piémont de la chaîne montagneuse de Chréa, wilaya de Blida en Algérie.

2. Lieux d'expérimentation :

Au cours de notre travail expérimentale nous avons étudié différentes activités de la plante. Ces dernies ont lieu dans différents laboratoire qui sont présentés ci-dessous :

- L'extraction des huiles essentielles et des extraits phénoliques ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante ont été réalisé au sein du laboratoire de recherche sur les produits bioactifs et la valorisation de la biomasse de l'ENS de Kouba.
- L'étude de l'activité antimicrobienne est réalisée au niveau du laboratoire d'hygiène et de contrôle alimentaire de la wilaya de Blida.
- Pour l'étude toxicologique est réaliser dans : le laboratoire d'histologie et biologie animale de l'ENS de Kouba, le laboratoire de cytologie et d'anatomopathologie CHU-Hussein Dey, Alger.

1. Matériel

1.1 Matériel végétal et identification

Le matériel végétal utilisé au cours de notre étude provient de la plante *Thapsia garganica* L (thapsia, Bounafaa, Adéryés), les deux parties de cette plante : aérienne (tiges et feuilles) et souterraine (racines) sont ciblées dans cette étude.

Les récoltes ont été réalisées pendant l'année courante (2013) à différentes dates (17 Janvier, 17 Février, 17 Mars, 21 Mars et 25 Mars) dans le piémont de la chaîne montagneuse de Chréa, wilaya de Blida, Algérie, dans un verger d'olivier où aucun fertilisant ou pesticides chimiques n'est utilisé ou le risque d'autres sources de contaminations et de pollution.

L'identification de cette plante a eu lieu au département d'agronomie à l'université Saad Dahleb de Blida par Mr. Metail.

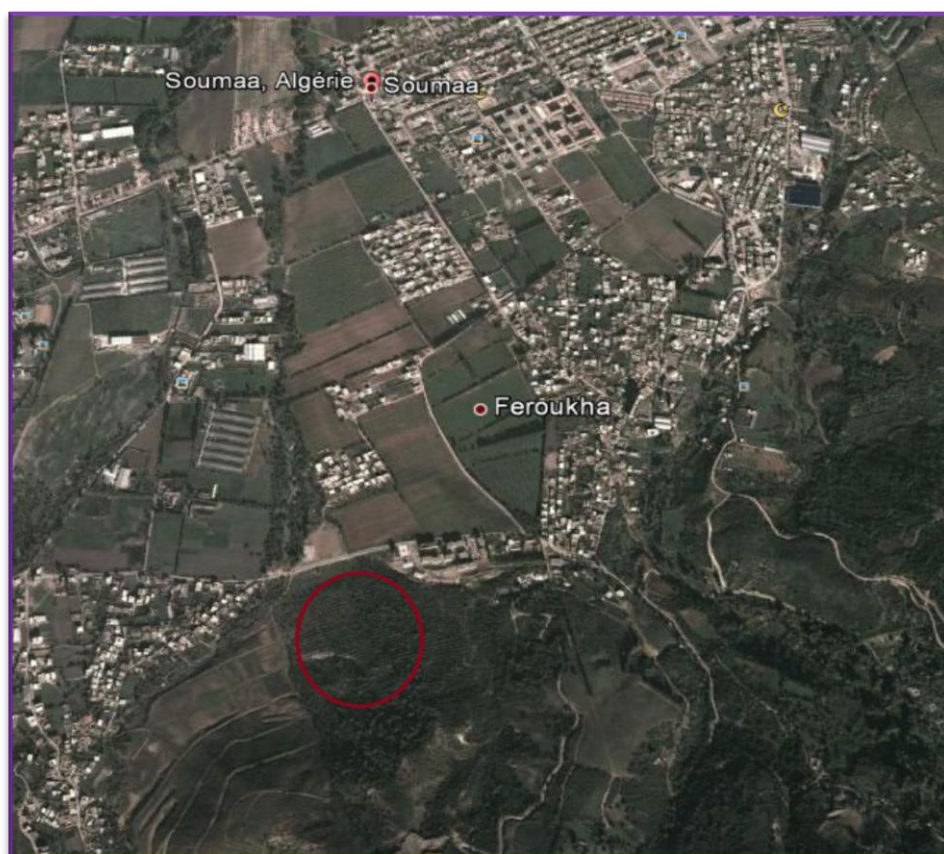


Figure 22 : Lieu de prélèvement de *Thapsia garganica* L.

3.2 Réactifs chimiques et appareillage

L'ensemble des réactifs chimiques utilisés au cours de notre expérimentation sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 1 : réactifs chimique et appareillage au cours de notre expérimentation.

| | | Réactifs chimique : | Appareillage : |
|--|-------------------------------|---|---|
| Extraction des huiles essentielles | | Dichlorométhane CH ₂ Cl ₂ NaCl, Na ₂ SO ₄ | Clevenger, chauffe ballon, rotavapeur. |
| Extraction des composés phénoliques | | Méthanol, Chloroforme, butanol | Soxhlet, chauffe ballon rotavapeur |
| l'activité antioxyd -ante | La méthode du DPPH : | Éthanol, le DPPH, eau distillé | spectrophotomètre UV-Visible, vortex, |
| | La méthode de b-carotène : | La b-carotène, tween 40, chloroforme, acide linoléique, éthanol | agitateur magnétique. spectrophotomètre UV-Visible, vortex. |
| | La méthode FRAP : | KH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄ , TCA, FeCl ₃ , K ₃ Fe(CN) ₆ | spectrophotomètre UV-Visible, vortex, centrifugeuse, |
| Dosage des phénols totaux | | Acide gallique, réactif Folin Ciocalteu, Na ₂ CO ₃ | Vortex, bain marie, spectrophotomètre UV-Visible |
| Activité antimicrobienne | | Milieu de culture : Miller Hinton et sabouraud, Tween 40. | Autoclave, étuve, bec benzen, boîtes pétri, papier Watmen. |
| Étude toxicologique | | Chloroforme, formole, xylène, éthanol, Hématoxyline, éosine | Automate, microtome, bain marie, étuve |

Partie I : extraction des huiles essentielles et des extraits phénoliques

Les différentes parties de la plante de chaque récolte sont nettoyées à l'aide d'une brosse pour éliminer le reste de terre et de poussière ainsi que d'autres impuretés. Après 21 jours de séchage à l'air libre, à température ambiante autour de 21°C, à l'abri de la lumière et dans un endroit sec, la plante est soumise à un broyage et à un tamisage avant chaque extraction.

I.1. Extraction des huiles essentielles :

I.1.1. Principe :

Il existe différents procédés d'extraction des HE (distillation, solvants volatils, expression à froid et CO₂ supercritique) mais, seuls quelques uns assurent une bonne qualité finale. Dans notre cas, les huiles essentielles ont été extraites par Hydrodistillation en utilisant un appareil de type Clevenger (**Clevenger, 1928**) préconisé par la Pharmacopée Européenne. Cet appareil qu'on peut définir comme forme aqueuse et gazeuse et la cohobation de l'huile essentielle. Le Clevenger permet de condenser les vapeurs formées au cours de cette ébullition dans son réfrigérant pour former deux phases distinctes : une phase organique qui représente l'huile essentielle pure, et une phase aqueuse ou l'hydrolat qui représente l'HE mélangée avec l'eau.

I.1.2. mode opératoire :

Cette méthode d'extraction consiste à porter à ébullition 100g de matière végétale dans 2/3 du ballon de l'eau distillée (soit 1,25 L dans un ballon de 2 L) avec quelques grains de pierre ponce pendant 4heurs après l'apparition de la première goutte (**DAMIAN et al., 2011 ; BEGUM et al., 2008**).

La phase organique est récupérée directement, suivie d'un rinçage du Clevenger avec le dichlorométhane (pour récupérer le maximum de notre HE). L'hydrolat est récupéré séparément et, dans une ampoule à décanter en lui rajoute le dichlorométhane et l'agent relargant NaCl ou le KCl pour établir une extraction liquide-liquide ; Après avoir mélangé et laissé décanter, on récupère la partie inférieure (HE mélangée avec le solvant). Cette opération est faite 3 fois pour chaque hydrolat récupéré (**DAMIAN et al., 2011 ; BEGUM et al., 2008**).

L'HE récupérée des deux phases (aqueuse et organique) est rassemblée et séché par l'agent desséchant le Na_2SO_4 ; ensuite dans un petit ballon le solvant est éliminé à l'aide d'un rotavapeur à une température de 40°C et sous vide (**Annexe 2**).

Le rendement d'extraction est calculé suivant la formule ci-dessous:

$$Rdt (\%) = (M_{HE} / M_{MV}) \times 100$$

Avec : Rdt : rendement d'extraction; M_{HE} : masse de l'huile essentielle; M_{MV} : masse de la matière végétale.

Les HE récupérée est conserver dans des flacons propres et secs en verre teinté, fermés de façon étanche, stockage à -4°C à l'abri de la lumière.



Figure 23 : obtention des HE par hydrodistillation montage Clevenger.

I.2. La préparation des extraits phénoliques

1.2.1. Principe :

Les extraits bruts des feuilles-tiges et des racines des différentes récoltes ont été obtenus par extraction grâce à un solvant volatil en utilisant un appareil de type *soxhlet* qui permet d'extraire les composés non volatiles et semi-volatiles. Malgré son ancienneté (son invention date de 1879 par Franz Von Soxhlet), cette méthode reste la plus pratiquée (**Annexe 3**).

Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, le cyclohexane, l'éthanol, le méthanol, le dichlorométhane et l'acétone. En plus d'être autorisé, le solvant devra posséder une certaine stabilité face à la chaleur, la lumière ou l'oxygène, et sa température d'ébullition sera de préférence basse afin de faciliter son élimination et il ne devra pas réagir chimiquement avec l'extrait.

I.3.2. Mode opératoire

Pour cette extraction 20 g de matière végétale broyée a été placée dans du papier filtre à l'intérieur du *Soxhlet*, qui est fixé à la partie inférieure d'un réfrigérant et à la partie supérieure d'un ballon contenant 350 ml du méthanol porter à la chaleur.

Le solvant (méthanol) est donc vaporisé puis condensé, il traverse le lit de la matière végétale par percolation pour donner une solution qui est soutirée périodiquement. La solution du ballon s'enrichit petit à petit en soluté et la matière végétale est toujours mis en contact avec du solvant fraîchement distillé. Après 6 cycles, on arrête l'extraction. Le solvant est éliminé à l'aide d'un rotavapeur à 45 °C avec une rotation de 220 rpm (**ELMEZOGI et al., 2012**).

Le concentré d'extrait méthanolique est récupéré par l'eau distillée chaude et dans une ampoule à décanter il sera soumis à une double extraction liquide-liquide, la première avec le chloroforme pour éliminer les composés lipidique et la chlorophylle, et une deuxième avec le butanol afin d'extraire tous les composés phénoliques (Chaque étape est pratiquée 03 fois) (**HAMMOUDI et al., 2012**).Après l'évaporation du butanol à 65°C et sous vide, l'extrait est conservé à -4°C à l'abri de la lumière.

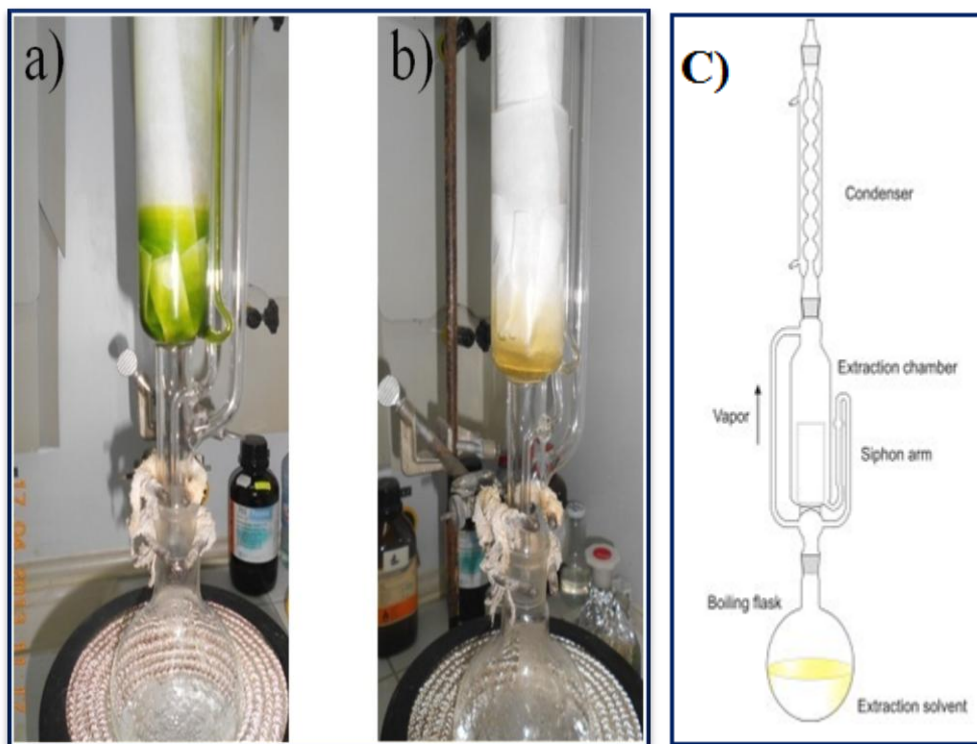


Figure 24 : Obtention des extraits bruts de *Thapsia garganica L* par montage *Soxhlet*. a) extrait brut des feuilles de couleur jaune verdâtre ; b) extrait brut des racines de couleur jaune brun ; c) schéma d'un soxhlet.

I.4. Dosage des phénols totaux :

I.4.1. Principe :

Ce dosage repose sur la méthode utilisant le réactif de Folin Ciocalteu. Ce réactif qui est de couleur jaune est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Dans un milieu basique et en présence de ce réactif, les phénols s'oxydent et réduisent ce réactif en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (MO_8O_{23}). L'intensité d'absorption est proportionnelle à la quantité de phénols présents dans l'échantillon (ANESINI *et al.*, 2008).

La quantification des phénols totaux s'établit par rapport à une courbe d'étalonnage linéaire ($y = a \alpha + \beta$) réalisé avec l'acide gallique à différentes concentrations (ANESINI *et al.*, 2008).

Ce dosage est très sensible mais peu spécifique car d'autres composés non aromatiques peuvent également être oxydés (**BENSAADA et HADJ MEHDI, 2012**).

I.4.2. Mode opératoire :

Préparation des échantillons d'extrait et de l'étalon acide galique :

- Préparation une solution mère de 0.5mg/ml d'étalon acide gallique.
- Préparation une série des solutions filles de différente concentration allant de 0.003 mg/ml à 0.013mg/ml.
- Préparation des solutions mère pour chaque échantillon d'extrait phénolique de concentration de 2mg/ml (**BENSAADA et HADJ MEHDI, 2012**).

Protocole expérimental :

- Prélever 0.5ml de solution de chaque échantillon (solution fille pour l'étalon et solution mère pour les extraits phénoliques) et les mettre dans des tubes à essai.
- Rajouter 7 ml d'eau distillée.
- Rajouter 0.5 ml du réactif Folin-Ciocalteu dilué à 10fois.
- vortexer les tube à essai pendant 3 minutes.
- Ajouter 2 ml de solution de Na_2CO_3 à 20 %.
- Incuber dans un bain mari à 100°C pendant 1minute.
- Laisser les tubes à essai refroidir à l'obscurité.
- Mesurer l'absorbance à 760nm.

Partie II : Évaluation de l'activité antioxydante

Selon la définition générique, les antioxydants sont des substances qui, à faible concentration, sont capables d'inhiber ou de retarder de manière significative les oxydations des molécules. Les antioxydants protègent les molécules *in vitro* mais également au sein de notre organisme en empêchent le vieillissement prématuré des cellules (CILLARD, 2007).

Si l'équilibre entre la formation des radicaux libres et la protection assurée par les antioxydants est rompu, les radicaux libres peuvent devenir nocif pour l'organisme, il est alors question de stress oxydatif (CILLARD, 2007).

Ces dernières années, l'utilisation des molécules antioxydantes de synthèse (ex : BHT et BHA) est remise en cause en raison des risques toxicologiques potentiels (BOUGANDOURA, *et al.*, 2012). Désormais, l'intérêt est porté sur les antioxydants naturels, grâce à leurs propriétés thérapeutiques qui ont augmenté considérablement. Des recherches dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales et les produits agroalimentaires (POPOVICI *et al.*, 2009).

Les herbes aromatiques consommées quotidiennement dans les régions méditerranéennes, sont une source naturelle de composés phytochimiques issus du métabolisme secondaire et qui sont doués d'une activité antioxydante (BOUROUF *et al.*, 2009).

Les antioxydants naturels les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques. En effet, la plupart des antioxydants possèdent des groupes phénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (OH^\bullet) et superoxydes (O_2^\bullet) (POPOVICI *et al.*, 2009).

Dans le but d'évaluer de l'activité antioxydante des huiles essentielles et les extraits phénoliques de *Thapsia Garganica L* et pour mieux l'estimer, trois méthodes basées sur trois principes différents pour l'évaluation de cette activité sont réalisées, la

méthode de : piégeage du radical DPPH, blanchiment de β -carotène et la méthode FRAP.

Préparation des échantillons

La préparation des solutions mères de chaque échantillon (des huiles essentielles et des extraits phénoliques, feuilles-tiges et racines, des différentes récoltes, BHT et BHA) sont de concentration uniforme de 4mg/ml dilué dans l'éthanol pour les HE, BHT, BHA et l'eau distillé pour les EXT.

La concentration entre les feuilles et les racines au sein d'un même échantillon (HE ou EXT) est uniforme. Celle des EXT est inférieure à celle des HE car les EXT ont une activité beaucoup plus importante.

Un contrôle négatif est effectué dans les mêmes conditions pour chaque méthode. Pour chaque échantillon et pour chaque concentration on effectue 3 répétitions.

II.1. La méthode de piégeage du radical DPPH

II.1.1 Principe

Cette méthode est basée sur la réduction du radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) qui possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (Figure 23). Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères et le DPPH reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire (**POPOVICI et al., 2009**). Cette délocalisation donne également lieu à la couleur violette foncé, caractérisé par une absorbance dans une solution d'éthanol centré à environ 517 nm.

Quand une solution de DPPH est mélangée avec une substance antioxydante qui peut céder un atome d'hydrogène, cela donne lieu à la forme réduite DPPH-H (2) avec perte de cette couleur violette en une couleur jaune pâle (**MOLYNEX et al., 2004**).

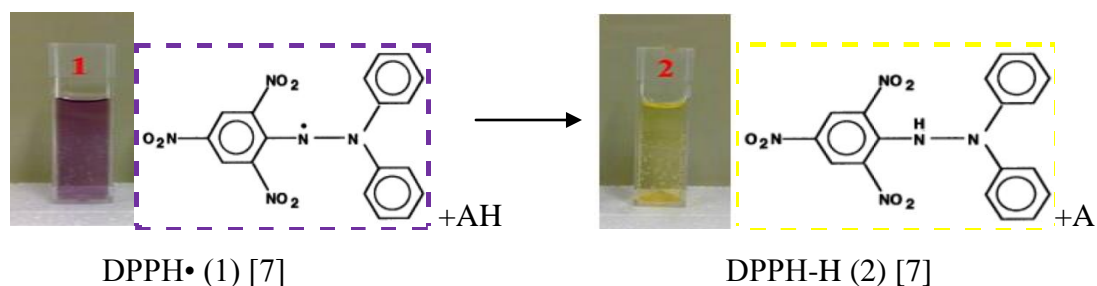


Figure 25 : réaction de réduction d'un radical DPPH en présence d'un antioxydant ainsi que leur colorimétrie.

II.1.2. Mode opératoire :

- Préparation de la solution de DPPH d'une concentration de 4mg/ 1ml d'Ethanol.
- Mettre dans des tubes à essai des volumes différents de la solution mère de chaque échantillon (pour les HE : 25µl, 50µl, 100µl et pour les EXT : 5µl, 10µl, 25µl), additionné de 1ml de la solution DPPH.
- Les références (BHT, BHA) suivent la concentration des échantillons (HE, EXT)
- Après une période d'incubation de 30min à une température ambiante et à l'abri de la lumière et de l'O₂ l'atmosphérique, l'absorbance est mesurée à 517 nm. (SAFAEI-GHOMI et al., 2010).

L'activité antioxydante est estimée selon l'équation suivante:

$$AA \% = ([Abs_{control} - Abs_{éch}] / Abs_{control}) \times 100$$

Avec : AA : activité antioxydante, Abs : absorbance à 517 nm.

II.2. La méthode de β-carotène:

II.2.1. Principe :

Cette méthode se base sur la décoloration de la β-carotène résultant de son oxydation par les produits de décomposition de l'acide linoléique. La dispersion de l'acide linoléique et du β-carotène dans la phase aqueuse est assurée par du Tween 40. L'addition d'antioxydants purs ou sous forme d'extraits végétaux induit un retard de la cinétique de décoloration du β-carotène. Cette méthode est sensible, rapide et simple s'agissant d'une mesure spectrophotométrique dans le visible. La couleur

jaune si elle persiste, indiquent la présence de substances antioxydantes (LAGUERRE *et al.*, 2007)

II.2.2. Mode opératoire :

- Préparation de l'émulsion (β -carotène/acide linoléique) qui contient la - β carotène (0.5mg/ ml chloroforme), 25 μ l d'acide linoléique et 200 mg de tween 40.
- Evaporation complète du chloroforme par le rotavapeur sous vide.
- L'ajout de 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène avec une agitation vigoureuse.
- La réparation des solutions filles se fait selon le tableau suivant :

Tableau 2 : les concentrations des solutions filles.

| Concentration des SF recherchée mg/ml | Les huiles essentielles | | | Les extraits phénoliques | | |
|---------------------------------------|-------------------------|-----|-----|--------------------------|------|-----|
| | 0.1 | 0.2 | 0.4 | 0.02 | 0.04 | 0.1 |
| Volume prélevé de la SM μ l | 25 | 50 | 100 | 5 | 10 | 25 |

- Dans des tubes à essai, mettre 2.5 ml de l'émulsion et 350 μ l de chaque solution fille (de différente concentration avec 3 répétitions).
- Incubation à l'abri de la lumière et à température 48 heures.
- La lecture des absorbance sont faitent à t_0 , 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 24h et 48h. à une longueur d'onde de 490 nm (ATHAMENA *et al.*, 2010).
- L'activité est estimée selon la formule suivante :

- **Activité relative :**

$$\text{Act}_{re} \% = \text{abs}_{ech\ t\ 48h} / \text{abs}_{BHT\ t\ 48h}$$

Avec: $\text{Act}_{re} \%$: activité relative ; abs_{ech} : absorbance de l'échantillon ;
 abs_{BHT} : absorbance du BHT.

- **Activité :**

$$\text{Act \%} = (1 - (\text{abs}_{\text{ech t 48h}} - \text{abs}_{\text{ech t 0h}}) / (\text{abs}_{\text{cont t 48h}} - \text{abs}_{\text{cont t 0h}}))$$

Avec : Act % : activité en % ; abs_{ech} : absorbance de l'échantillon ; abs_{cont} : absorbance du contrôle.

II.3. La méthode FRAP (Ferric reducing antioxidant power)

II.3.1. Principe :

Il est universel, peut être appliqué aussi bien chez les plantes que les plasmas et dans les extraits organiques et aqueux, cette méthode créée par « Oyaizu, 1986 » est basée sur la réduction du fer ferrique Fe^{3+} présent dans le complexe ferrocyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en fer ferreux Fe^{2+} . La réaction est révélée par le virement de la couleur jaune du fer ferrique en couleur bleu vert du fer 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 700nm (**BOUGANDOURA et al., 2012**).

II.3.2. Mode opératoire:

- Dans un tube à essai contenant 0.5 ml de solution fille sont ajoutés 1,25 ml de tampon phosphate (0,2M, pH 6,6) puis 1,25 ml d'hexacyanoferrate de potassium [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] (10g/l).
- L'ensemble est chauffé à 50°C au bain marie pendant 20 minutes.
- Un volume de 1,25 ml d'acide trichloracétique (100 g/l) est ensuite ajouté et le mélange est centrifugé à 3000 tours/min pendant 10 minutes.
- Enfin, 1,25 ml du surnageant ont été mélangés avec 1,25 ml d'eau distillée et 0,25 ml de chlorure ferrique [FeCl_3] (1 g / l).
- La lecture est mesurée à 700 nm (**BOURKHISS et al., 2010 ; BANGL et al., 2008**).


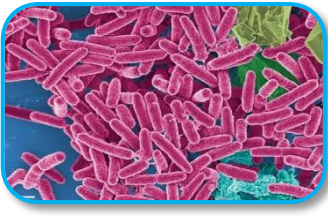
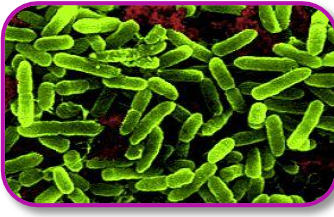
Partie III : Étude du pouvoir antimicrobien





Dans le but d'évaluer le pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle ainsi que de l'extrait, nous avons testés ces derniers sur **7** micro-organismes. (3 bactéries Gram⁻, 2 levures et 2 champignons).

Les souches utilisées proviennent de l'hôpital de Boufarik, ils sont choisis pour leur fréquence élevée à contaminer les denrées alimentaires et pour leur pathogénicité.

Le tableau suivant illustre : les noms, références, allures sous le microscope électronique et les principales pathologies causées par ces micro-organismes utilisées.

Tableau 3 : Références, allures et pathologies des souches utilisées.

| Souches | Noms : | Référence : | Allures : | Pathologies : |
|------------------|-------------------------|-------------|--|---|
| Bactéries Gram - | <i>Escherichia coli</i> | ATTC 25422 |  | Pathogène : Gastro-entérites, infections urinaires, méningites, ou Sepsis. |
| | <i>Pseudomonas impr</i> | ATTC3547 |  | Pathogène : Flore de transit sur la peau et les muqueuses et cause des surinfections de plaies ou brûlures. |
| | <i>Salmonella typhi</i> | / |  | Pathogène : la fièvre typhoïde, la fièvre paratyphoïde et la toxi-infection alimentaire. |

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

L'analyse microbiologique a pour principe de mettre à chaque fois une souche microbienne en contact avec l'huile essentielle ou l'extraits phénoliques à différentes concentrations et ceux dans un milieu de culture solide (préalablementensemencé) approprié pour chaque micro organisme.

Dans notre étude nous avons mis en évidence le pouvoir antimicrobien de nos huiles essentielles et de nos extraits phénoliques par la méthode de l'aromatogramme (ou diffusion sur milieu gélosé). Dans le but d'affiner ces résultats, nous avons essayé de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) par la méthode de dilution sur le milieu gélosé.

III.1. Protocole expérimental

III.1.1. L'aromatogramme

L'aromatogramme est une méthode inspiré de l'antibiogramme. Elle permet de déterminer l'activité des huiles essentielles ou des extraits à inhiber la croissance des germes cibles. Cette méthode repose sur le pouvoir de diffusion des huiles essentielles ou de l'extrait sur un milieu solide à l'intérieur d'une boîte de Pétri, qui va nous permettre de mettre en évidence l'effet antibactérien de l'huile essentielle sur les bactéries, ainsi que la détermination de la résistance ou la sensibilité de ces bactéries vis-à-vis de cette huile essentielle, par la mesure du diamètre d'inhibition autour du disque de cellulose imprégné de nos extraits ou de nos huiles essentielles (**BILLERBECK, 2007**).

➤ Préparation de nos échantillons à tester

Afin d'étudier le pouvoir antimicrobien de nos échantillons (Huile essentielle et extrait), on a préparé une solution mère de 50 mg d'huile essentielle ou de l'extrait phénolique de chaque récolte (04 récoltes) et de chaque partie (feuille-tige et racine) diluer dans 4ml de méthanol, on a obtenu 16 solution mère à tester.

➤ Préparation du milieu de milieu

On fait fondre les milieux Muller Hinton et Sabouraud dans un bain marie à 95°C, après on verse aseptiquement dans des boites de pétri à raison de $\frac{3}{4}$ du volume total de la boîte, on laisse refroidir et solidifier sur paille.

➤ Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture jeune des bactéries, champignons et levure, on réalise des suspensions troubles selon le Protocole suivant :

- Casser l'extrémité d'une pipette pasteur et la faire passer rapidement à la flamme ;

- Ouvrir la boîte pétri contient le germe, et prélever aseptiquement 03 à 04 colonies isolées et identiques ;
- Déboucher le tube contenant 05 mL d'eau physiologique stérile et faire déposer les colonies prélevées ;
- Passer l'ouverture du tube contenant la suspension de germe à la flamme avant de la renferme.
- Agiter au vortex.
- On réalise une première lecture de la concentration de la suspension à l'aide d'un densimètre qui doit être égale à 05 CFU/mL ;
- Si la valeur trouvée durant la première lecture est supérieure à 05 CFU/mL, on l'ajuste tout en ajoutant de l'eau physiologique, si elle est inférieure à la valeur maximale, dans ce cas, on doit ajouter des colonies et on fait une deuxième lecture.
- Recommencer toutes ces opérations avec tous les autres germes testés.

➤ **Préparation des disques**

Les disques sont fabriqués à partir du papier Wattman N° 3, avec un diamètre de 9mm par l'emporte-pièce. Ensuite, ces disques sont mis dans un tube à essai, stérilisés à l'autoclave, puis stockés à une température ambiante (le tube à essai est hermétiquement fermé).

➤ **Ensemencement**

Après solidification du milieu de culture, la suspension bactérienne à tester est étalés sur la surface du milieu de culture sous forme de strie serré dans des boîtes pétri contenant de 20 ml de Muller Hinton (pour les boîtes destiner à tester les bactéries) et 20 mL Sabouraud (pour les boîtes destiner à tester les champignons et les levures).

➤ **Dépôt des disques**

Dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pince stérile, des disques de papier Wattman (04disques/boîte) sont déposés sur le milieu de culture précédemment inoculé avec le microorganisme choisi, puis les imbibés par 30 et 70 μ L d'huile essentielle et d'extrait phénolique de *thapsia garganica L.*

Les boites sont maintenues à 4°C pendant 4h pour que l'huile essentielle ou l'extrait phénolique puisse diffuser.

➤ Incubation

Les boîtes ont été incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 h pour les boîtes qui sont ensemencées de bactéries et 48 heures pour ceux ensemencés par les champignons et les levures.

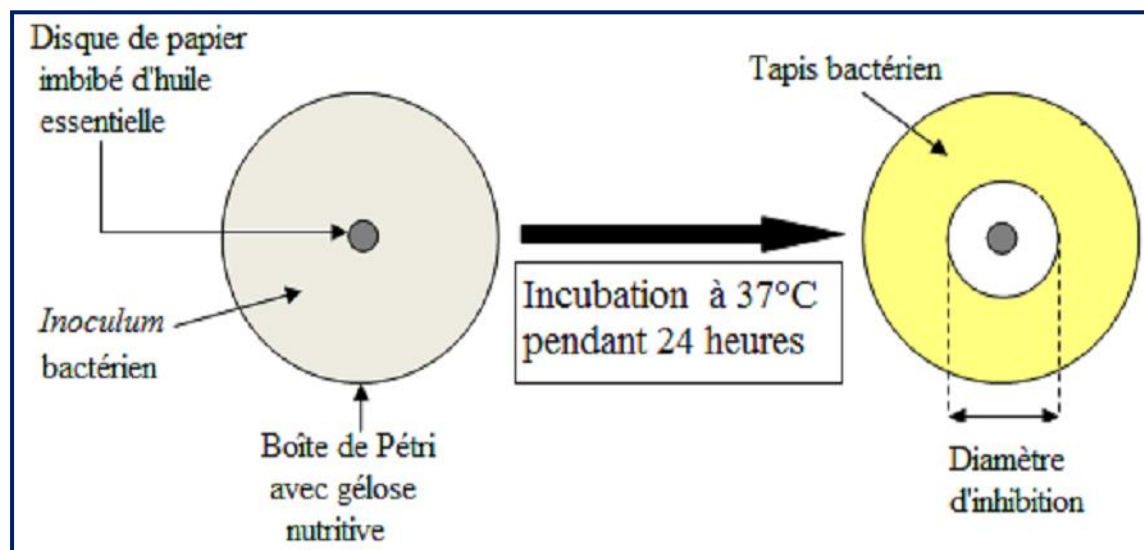


Figure 26 : illustration de la méthode d'Aromatogramme sur boîte Pétri.

III.1.2. Dilution sur le milieu gélosé

La Société Française de Microbiologie (SFM) définit la résistance naturelle comme la caractéristique d'une espèce bactérienne qui se traduit par des concentrations minimales inhibitrices (CMI) supérieures à la concentration critique

Pour évaluer le degré de résistance d'une bactérie, différents tests de sensibilité ont été mis au point, ayant pour but de déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) d'un échantillon vis à vis de la bactérie, ce teste permet de classer les bactéries selon leurs sensibilités en : sensible, intermédiaire ou résistante.

La CMI est donc la capacité de résistance naturelle ou intrinsèque correspond à une résister en présence d'un antibiotique pour toutes les souches d'une espèce ou d'un genre bactérien. (PEYROU *et al.*, 2001).

➤ Préparation des échantillons a testé

Dans 4 mL de méthanol on fait diluer 120 mg des huiles essentielles et des extraits de chaque récolte et de chaque partie de la plante.

➤ **Préparation de l'inoculum**

Les mêmes étapes que celui de l'aromatogramme avec les mêmes concentrations de la suspension bactérienne.

➤ **Préparation des boîtes de pétri**

Les boîtes de pétri sont divisées en 03 segments pour les bactéries et 04 segments pour les champignons et les levures, par la suite on coule dans chaque boîte de pétri 20 ml de milieu de culture approprié (Muller Hinton pour les boîtes destinées à êtreensemencées par les bactéries et le Sabouraud pour ceux destinées à êtreensemencées par les levures et les champignons) mélangé à différentes concentrations des échantillons (5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 300 µl). Après solidification du milieu de culture on passe à l'ensemencement.

➤ **Ensemencement**

Chaque suspension bactérienne à tester est étalée sur un segment de la boîte pour chaque bactérie on a fait deux répétitions.

➤ **Incubation**

Les boîtes ont été incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 h pour les boîtes qui contiennent les bactéries et 48 heures pour ceux qui contiennent les champignons et les levures.

Partie IV : Etude histopathologique du foie

Notre but c'est d'apprécier l'effet toxicologique des huiles essentielles et des extraits phénoliques à raison de 0.01g/kg de poids corporel par la méthode de gavage chez des souris mâles en croissance de souche wistar pendant 20 jours. Cette étude est basée sur l'éventration des effets de ces huiles essentielles et extraits phénoliques sur le foie.

IV.1. Matériel

IV.1.1. Animaux de l'étude

Notre étude est réalisée sur 65 souris mâles ayant un poids moyen de 30 ± 2 g. dès leurs arrivées à l'animalerie depuis l'institut Pasteur de Kouba, les souris sont soumises à une période d'acclimatation pendant 10 jour, à température ambiante et à une photopériode alternée de 12 heures d'obscurité suivie de 12 heures de lumière artificielle. Un aliment standard composée de : luzerne, orge, maïs, soja, CCV (complément complexe vitaminique), provenant de Bouzaréa, Alger, est fournis ainsi que l'eau de façon "*ad-libitum*".

Les souris sont hébergées dans des cages en plastique transparentes d'une longueur de 55 cm, une largeur de 33 cm et d'une hauteur de 19 cm, munies d'un couvercle, d'une mangeoire et d'une bouteille d'eau. Sur la surface de la boîte le nom du lot, le traitement subi, ainsi que les dates d'expérimentation ont été mentionné.

Les souris sont marquées chaque jour afin de préserver leur identité dans chaque lot. La litière utilisée est la sciure de bois, qui est renouvelée tous les deux jours. Toutes les manipulations sont faites à la même heure pour éviter de stresser les souris.

IV.1.2. Échantillons administrés

Les tests de toxicité ont été réalisés sur les huiles essentielles et extraits phénoliques des feuilles et des racines de *thapsia garganica L* des récoltes du 17 Février, 21 et le 25 Mars 2013.

Des préparations à base d'huile essentielle et des extraits phénoliques de chaque partie de la plante (feuille et racine) et de chaque récolte (17 février, 21 et 25 mars) sont

utilisées sous forme de solution mère concentrée de 15 mg par 25 mL de diluant. Les huiles essentielles sont diluées dans de l'huile de soja et les extraits phénoliques sont dilués dans de l'eau distillée. Sachant que chaque souris reçoit 0.5 mL de notre solution chaque jour. La dose journalière qui à été admise est calculé comme suit :

$$\begin{array}{l} 25 \text{ mL} \longrightarrow 15 \text{ mg} \\ 01 \text{ mL} \longrightarrow X \end{array}$$

$$X = (01 \times 15) / 25 \qquad X = 0.6 \text{ mg/mL.}$$

$$\begin{array}{l} 1 \text{ mL} \longrightarrow 0,6 \text{ mg} \\ 0,5 \text{ mL} \longrightarrow Y \end{array}$$

$$Y = (0.5 \times 0,6) / 1 \qquad Y = 0,3 \text{ mg/souris}$$

IV.2. Méthodes

IV.2. Expérimentation

Après leurs séjours d'adaptation aux conditions du laboratoire, les 65 souris mâles utilisées dans notre expérimentation sont répartis en 13 lots.

Elles sont gavées par voie orale pendant 10 jours, par les solutions préparées. Des prises de poids ont été effectuées au début du traitement (J_1) et à la fin (J_{10}). Le lot des témoins on lui a administré de l'eau courante avec les mêmes volumes.

Dans le tableau suivant sont résumés les différents traitements (partie de la plante, récolte et type d'extraits) qui à subi chaque lot.

Tableau 4 : Différents traitements appliqués chez les souris.

| Récoltes | 17 février 2013 | | 21 mars 2013 | | 25 mars 2013 | | Témoins |
|--------------------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Huile essentielle | Lot 1 (n=5) | Lot 2 (n=5) | Lot 3 (n=5) | Lot 4 (n=5) | Lot 5 (n=5) | Lot 6 (n=5) | Lot 13 (n=5) |
| | feuille | racine | feuille | racine | feuille | racine | |
| Extrait phénolique | Lot 7 (n=5) | Lot 8 (n=5) | Lot 9 (n=5) | Lot 10 (n=5) | Lot 11 (n=5) | Lot 12 (n=5) | Eau courante. |
| | feuille | racine | feuille | racine | feuille | racine | |

IV.2. Sacrifice et prélèvement des échantillons

Après la prise des pesées corporelles et une légère anesthésie au chloroforme, les sacrifices sont réalisés par décapitation rapide et cela la matinée de 9h à 11h afin d'éviter les variations hormonales pendant la journée. Le parenchyme est prélevé et plongés dans le formol à 10% pour le fixer. Cet organe est destiné à l'étude histopathologique.

IV.3. Étude histopathologique

L'étude de la structure des tissus en microscopie repose sur la bonne préparation de leurs échantillons. La technique histologique passe par plusieurs étapes successives indispensables pour avoir de bons résultats. Dans notre étude, nous avons suivi les étapes présentés par le Gabe (1961).

IV.3.1. Fixation et rinçage des pièces

La fixation a pour but d'immobiliser les structures en respectant dans la mesure du possible leur morphologie, de les conserver et de permettre la confection des coupes sur une préparation permanente.

Les fragments des foies sont fixés dans le formol à 10% pendant 48 heures. puis rincées dans l'eau courante écouler pendant 24 heures.

IV.3.2. Déshydratation

Le but de la déshydratation est d'éliminer l'eau à partir du tissu pour permettre ensuite l'imprégnation à la paraffine.

Les fragments sont placée dans des cassettes à inclusion sur les quelles sont mentionner : le numéro de l'animal, l'organe et le traitement donné, puis lavés sous l'eau courante pour les débarrasser de l'excès du fixateur.

Avant de les inclure dans de la paraffine, les pièces doivent être soigneusement déshydratées. La déshydratation est réalisée automatiquement via un appareil «le Technicon». Cet appareil comporte plusieurs flacons déposés en série selon un ordre bien déterminé : 06 bains remplis d'alcool à concentration croissante (02 bains de 70%, 02 bains de 90%, 02 bains de 100%) qui ont pour but de déshydraté les tissus. Suivie de 02 bains de xylène pur pour permettre d'éliminer l'alcool à partir

des tissus (et le remplacer par le réactif de compensation), 02 bains d'un mélange xylène paraffine enfin 02 bains de paraffine maintenu a 60°C où les cassettes contenant les pièces (organes) vont séjourner successivement pendant des durées variables.

Le temps total de passage des pièces dans le Technicon est de 16h, après cette période les pièces sont récupérées pour passer à l'inclusion.

IV.3.3. Inclusion

Le paraffinage a lieu grâce à un appareil muni d'un compartiment alimenté en chaleur pour faire couler la paraffine (56°C-58°C), et d'une plaque refroidissant sur laquelle est mis un moule métallique contenant les cassettes où les pièces sont mises à nu. Une fois les pièces couvertes de paraffine liquide sont laissées refroidir sur une plaque métallique réfrigérée, ainsi, on obtient les blocs qui seront utilisés pour donner de fines coupes. Les blocs sont conservés au froid jusqu'à la coupe des pièces.

IV.3.4. confection des coupes

Cette étape permet d'obtenir des coupes destinées à l'examen au microscope. Ces coupes doivent être minces pour que la lumière les traverse aisément et avoir une solidité suffisante pour être manipulées.

Pour cela un microtome de type « Leica » à avance mécanique et couteau d'acier est utilisé. C'est un instrument assez complexe permettant de faire passer les pièces à couper devant le rasoir, à chaque passage celui-ci enlève une tranche d'épaisseur réglable (4 à 6Bm).

Pour enlever l'excès de paraffine, lorsque la pièce est affranchie et qu'elle paraît complète dans la coupe sur toute son étendue, on règle l'épaisseur avec un dispositif spécial. Le mouvement remis en marche, à chaque passage de la pièce, il se fait une coupe qui se colle automatiquement au bord de la coupe précédente. Ce qui nous permet d'obtenir un ruban de coupe.

IV.3.5. Collage des rubans des coupes et leur séchage

Le ruban fractionné est étalés dans un bain d'eau thermostatée de 37°C, puis récupérés et collés sur une lame de verre gélatiné, puis séchées a l'étuve à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Les lames ont été toutes marquées sur leur bord pour porter le numéro et la nature du tissu considéré, par un stylo à diamant. Ensuite ils sont mis dans une étuve à 37°C pour les faire séché.

IV.3.6. Déparaffinage et hydratation

Le déparaffinage sert à enlever la paraffine du tissu afin que les colorants puissent le pénétrer. Les coupes sont passées dans deux bains de xylène pendant 15 minutes chacun, faire passer les lames dans de l'eau distillée durant 01 minute.

L'hydratation a pour objet de retirer le xylène du tissu et de le remplacer par l'eau. Les fragments sont passés dans trois bains d'éthanol décroissant : 100°, 90°, 70° d'une durée de trois minutes chacun.

IV.3.7. Coloration

Le but de la coloration est de visualiser la structure tissulaire générale des organes ainsi que divers composants cellulaires. Dans notre étude nous avons appliqué la coloration de l'hématoxyline éosine qui est une coloration topographique.

La coloration est obtenue en plongeant la coupe dans des bains colorants comme suit :

- Coloration à l'hématoxyline : Plonger la coupe bien hydratée dans un bain d'hématoxyline pendant 03 mn, puis la faire un lavage à l'eau courante pendant 05 mn.
- Coloration à l'éosine : Plonger la lame dans le bain d'éosine pendant 01 mn, puis effectuer un lavage à l'eau courante.
- Déshydratation : faire passer la lame à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

IV.3.8. Montage et observation au microscope

après le montage d'une lamelle sur chaque coupe à l'aide d'une solution permettant l'adhésion (Eukit), les lames sont séchées sur un papier absorbant, nettoyées au xylène, puis observées au microscope photonique aux différents grossissements x 100, x 400, x 1000.

Dans cette partie, nous exposant l'ensemble de nos résultats et leurs discussions qui porte sur l'extraction des huiles essentielles et des extraits phénoliques des feuilles-tiges et des racines de *Thapsia garganica* L. des différentes récoltes 17 février, 17 mars et 21 mars, 25mars de la région de *Blida* et l'évaluation de leurs activités antioxydante et antimicrobienne ainsi que leur toxicité sur le foie.

Parti 1 : les rendements

I.1. En huile essentielle

Les huiles essentielles de *Thapsia garganica* sont obtenues par hydrodistillation montage *Clevenger*, pour les différentes récoltes et pour les deux parties : tige-feuille et racine, à partir de la matière sèche et dans les mêmes conditions. Cette huile essentielle est de couleur bleu, visqueuse, d'une odeur désagréable.

Les résultats obtenus du rendement sont donnés dans le tableau 5 et présentés dans la figure 27.

Tableau 5 : les rendements d'extraction des HE par hydrodistillation type *Clevenger* des différentes parties des différentes récoltes.

| | 17_01 | 17_02 | 17_03 | 21_03 | 25_03 |
|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| feuille | 0,0340% | 0,0480% | 0,0611% | 0,0727% | 0,0780% |
| racine | 0,0250% | 0,0280% | 0,0560% | 0,0622% | 0,0644% |

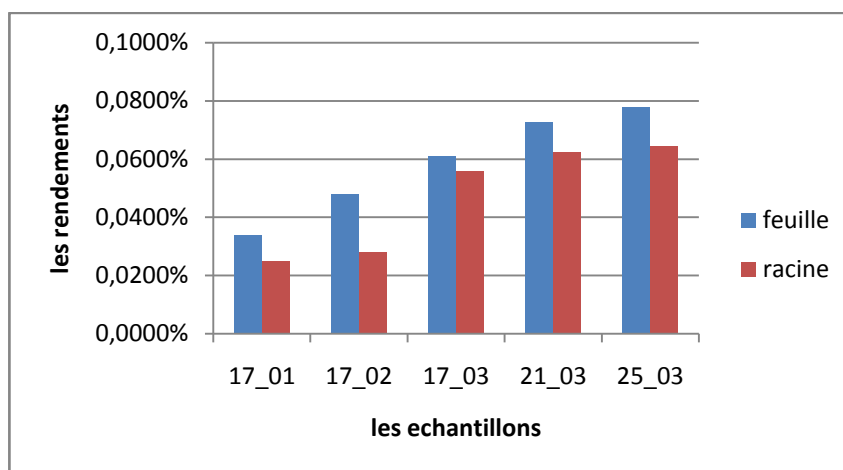


Figure 27 : histogramme du rendement d'extraction des HE des feuilles et des racines des différentes récoltes par hydrodistillation type *Clevenger*.

On observe des rendements d'extraction variant considérablement suivant les récoltes et les parties de la plante. Il faut noter que, comme pour les racines, les feuilles ont un rendement croissant depuis la première récolte réalisée en plein hiver jusqu'à la dernière récolte au début du printemps en passant d'un rendement de 0,0340%, 0,025% à 0,0780%, 0,0644% pour les feuilles et les racines respectivement. Cela nous permet de dire que les meilleurs rendements sont obtenus durant la période de floraison qui correspond à la dernière récolte. Cette variation du rendement d'une partie à une autre, d'une récolte à une autre peut s'expliquer par l'influence des facteurs écologiques et les facteurs physiologiques de la plante elle-même telle que le stade de végétation qui est connu par une forte influence sur différents paramètres.

Précédemment réalisée, les études sur *Thapsia Garganica* qui a été récolté dans d'autres régions et d'autres conditions (Kherrata (Bejaia) en Mars 2012, Khenchela Avril 2011, adeker (Bejaia) en Mars 2013), ont donnés des rendements différents, ces derniers sont illustrés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 6 : les différents rendements en huiles essentielles de *thapsia garganica* trouvés dans d'autres études.

| Région | Année et période | Rendement % | |
|-------------------|------------------|-------------|---------|
| | | feuilles | racines |
| Kherrata (Bejaia) | Mars 2012 | 0.09% | 0.06% |
| Khenchela | Avril 2011 | 0.29% | 0.22% |
| Blida | Mars 2013 | 0,078% | 0,0644% |
| Bejaia | Mars 2013 | 0.293% | 0.107% |

Se tableau exprime différent pourcentage du rendement qui varient selon la région où la récolte a eu lieu. Cette variation du rendement s'explique forcément après l'élimination des facteurs intrinsèques qui se résument en stade de végétation, par les facteurs extrinsèques qu'elle a subit cette plante, telle que le type de sol, les facteurs climatiques, facteurs géographique...etc. Ou d'autres facteurs que subit la plante après la récolte qui provoque la dégradation des HE comme le type d'extraction, l'état fraîche ou sec de la matière végétale, les conditions de séchage et les conditions de conservation après le séchage.

I.2. En extraits phénoliques

Les extraits méthanoliques préparés à partir des deux parties aériennes (tiges et feuilles) et souterraine (racines) de la plante de *Thapsia Garganica*, sont récupérés après extraction par *Soxhlet* et évaporés à sec. Ces derniers qui comportent un mélange de composés tels que la chlorophylle, les alcaloïdes, les phénols, les lipides, les lactones...etc, sont récupérés par de l'eau chaude, sont subis à une double extraction par le chloroforme puis avec le butanol pour l'extraction des polyphénols, cette extraction nous permet d'avoir les extraits phénoliques après leur évaporation à sec. Ces extraits sont pesés pour calculer les rendements qui sont donnés dans le tableau 7 et représentés sur la figure 28.

Tableau 7 : les rendements en extraits phénoliques des différents échantillons de *Thapsia garganica L.*

| | 17_02 | 17_03 | 21_03 | 25_03 |
|---------|-------|-------|-------|-------|
| Feuille | 0,734 | 1,805 | 1,409 | 1,178 |
| Racine | 0,691 | 0,812 | 1,326 | 0,572 |

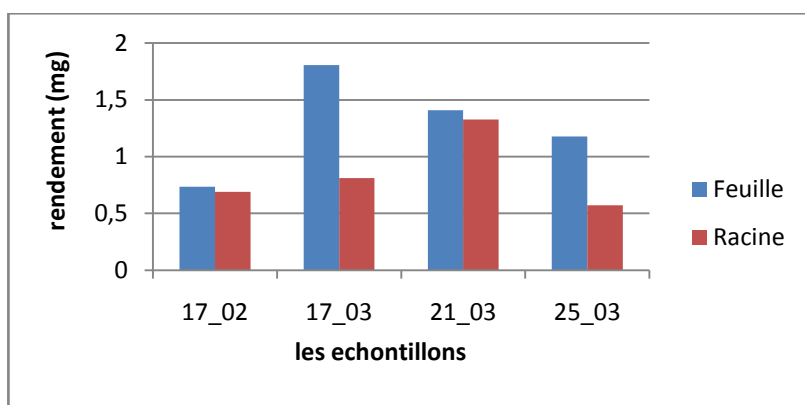


Figure 28: Les histogrammes des rendements en extraits phénoliques des différents échantillons de *Thapsia Garganica L.*

Les 04 récoltes de cette plante ont données des rendements en extrait phénolique qui diffèrent selon la période des récoltes et les parties de la plante.

Ce rendement qui augmente pendant l'hiver dans les feuilles jusqu'à 1,805g en 17-mars, il marque une diminution depuis la fin de cette saison pour arriver à 1,178g en 25-mars. Par ailleurs les racines ont un rendement croissant tout au long d'hiver (il passe de 0.691 à 1.326 du 17-févr. au 21 mars respectivement) il diminue après l'arrivée du printemps 0,572g à la

récolte du 25 mars. La comparaison entre le rendement des feuilles et celui des racines que en aucun récolte le rendement des racines et supérieure a celui des feuilles.

I.3. Dosage des phénols totaux

Dans le but de caractériser les extraits préparés précédemment, un dosage des phénols totaux a été réalisé en utilisant la méthode de *Folin – Ciocalteu* et en prenant l'acide gallique comme standard. Le choix de ces phénols totaux a été fait pour la connaissance de leurs propriétés antioxydantes et antimicrobienne assez importantes.

La spectrophotométrie a permis de quantifier le taux des phénols totaux dans ces extraits phénoliques. La courbe d'étalonnage effectuée par l'acide gallique à différentes concentrations (figure 29) et la teneur en phénols totaux sont rapportées en mg équivalent acide gallique/g d'extrait dans le tableau 8.

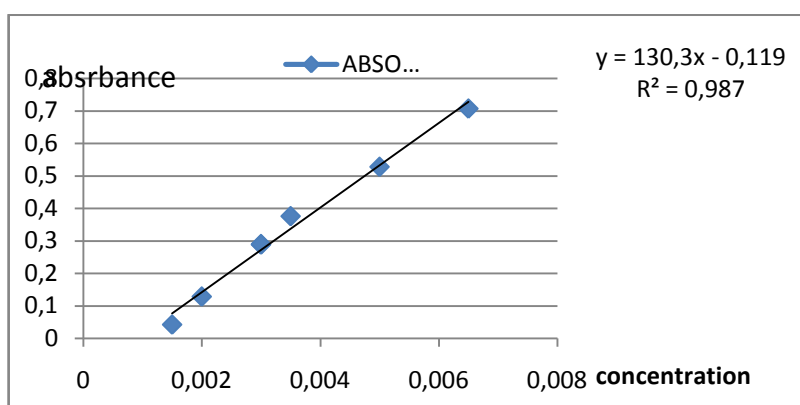


Figure 29 : la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Les teneurs en phénols totaux dans les différents extraits phénoliques de *Thapsia Garganica L* sont représenté dans le tableau suivant :

Tableau 8 : Résultat de la teneur en phénols totaux de l'extrait.

| | 17_02 | 17_03 | 21_03 | 25_03 |
|---------|---------|---------|---------|---------|
| feuille | 0,15372 | 0,22786 | 0,2637 | 0,2326 |
| racine | 0,13799 | 0,19202 | 0,24152 | 0,20437 |

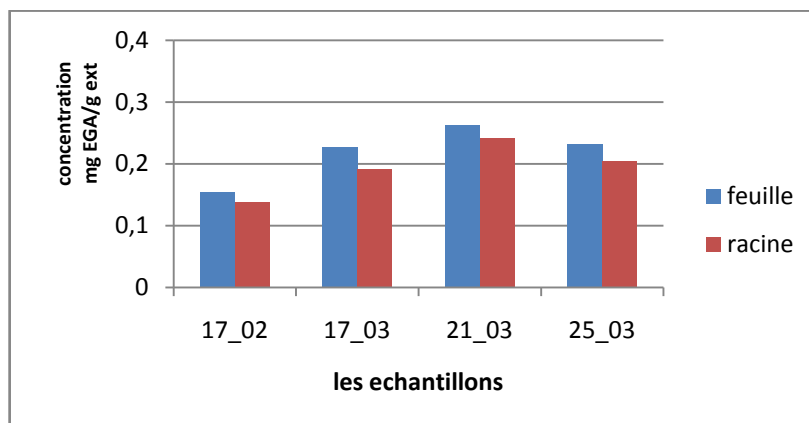


Figure 30 : Teneur en phénols totaux dans les différents extraits phénolique de *Thapsia Garganica* (mg Équivalent d'étalon/ g d'extrait).

La teneur en phénols totaux dans les extraits phénoliques varie d'un extrait à un autre. D'après le tableau on dit que les feuilles produisent d'avantage ces composés que les racines dans toutes les récoltes qu'on a réalisées, cette production elle augmente en hiver pour qu'elle redescend au début du printemps en passant par un pique au 21 mars d'un rendement de 0.2637g et 0.2415g pour les feuilles et les racines respectivement.

Une caractéristique des polyphénols et des huiles essentielles (qu'ils se présentent sous forme d'un ensemble de métabolites secondaires) qu'ils partagent généralement avec l'ensemble des métabolites secondaires, est la répartition très inégale chez les différentes espèces végétales et, pour une même espèce selon le stade d'évolution physiologique. Donc la distribution de ces composés peut varier pendant le développement de la plante. Ceci est être lié aux conditions climatiques et pédologiques comme la température élevée, exposition solaire, sécheresse, salinité...etc. et le stress de prédation qui stimulent leur biosynthèse, et les facteurs intrinsèques, tels que la partie ou le stade végétal.

Pour une espèce végétale donnée, les différents organes peuvent présenter des équipements phénoliques très différents (BOUTERFAS ; 2013)

Partie II : L'évaluation du pouvoir antioxydant

L'activité antioxydante exprime la capacité de piéger les radicaux libres. Pour nos extraits et nos huiles essentielles nous avons employé trois méthodes pour l'évaluation de cette activité : la méthode de piégeage du radical DPPH, la méthode de blanchiment du β -carotène et la méthode FRAP, qui sont basées sur 03 principes différents (RONALD L;2005). Deux antioxydants de synthèse (BHT : Butyl Hydroxy Toluène, le BHA : ButylBydroxyAnisol), sont pris comme référence.

II.1. La méthode de piégeage du radical DPPH

Son principe est basé sur la réduction du radical stable DPPH \cdot (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) à la forme DPPH-H en présence d'un antioxydant, ce qui provoque un changement colorimétrique du violet au jaune pâle.

Cette méthode a été réalisée sur les huiles essentielles des feuilles et ceux des racines différentes récoltes ainsi que leurs extraits.

II.1.1. Huiles essentielles

L'application de cette méthode sur nos huiles essentielles a révélé les résultats donnés dans le tableau 9 et présentées dans les figures 31 :

Tableau 9 : les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode DPPH sur les huiles essentielle de *Thapsia Garganica L.*

| | | les huiles essentielles | | | | | |
|----|---------|-------------------------|---------|---------|---------|--------|--------|
| | | 17-fevr | 17-mars | 21-mars | 25-mars | BHA | BHT |
| C1 | Feuille | 7,99% | 9,23% | 2,02% | 2,31% | 86,14% | 55,07% |
| | Racine | 3,90% | 4,98% | 6,97% | 11,81% | | |
| C2 | Feuille | 13,29% | 18,23% | 4,37% | 4,84% | 90,86% | 67,97% |
| | Racine | 7,56% | 9,52% | 11,30% | 19,42% | | |
| C3 | Feuille | 24,76% | 33,43% | 7,61% | 7,73% | 96,84% | 90,36% |
| | Racine | 14,02% | 16,74% | 21,02% | 26,93% | | |

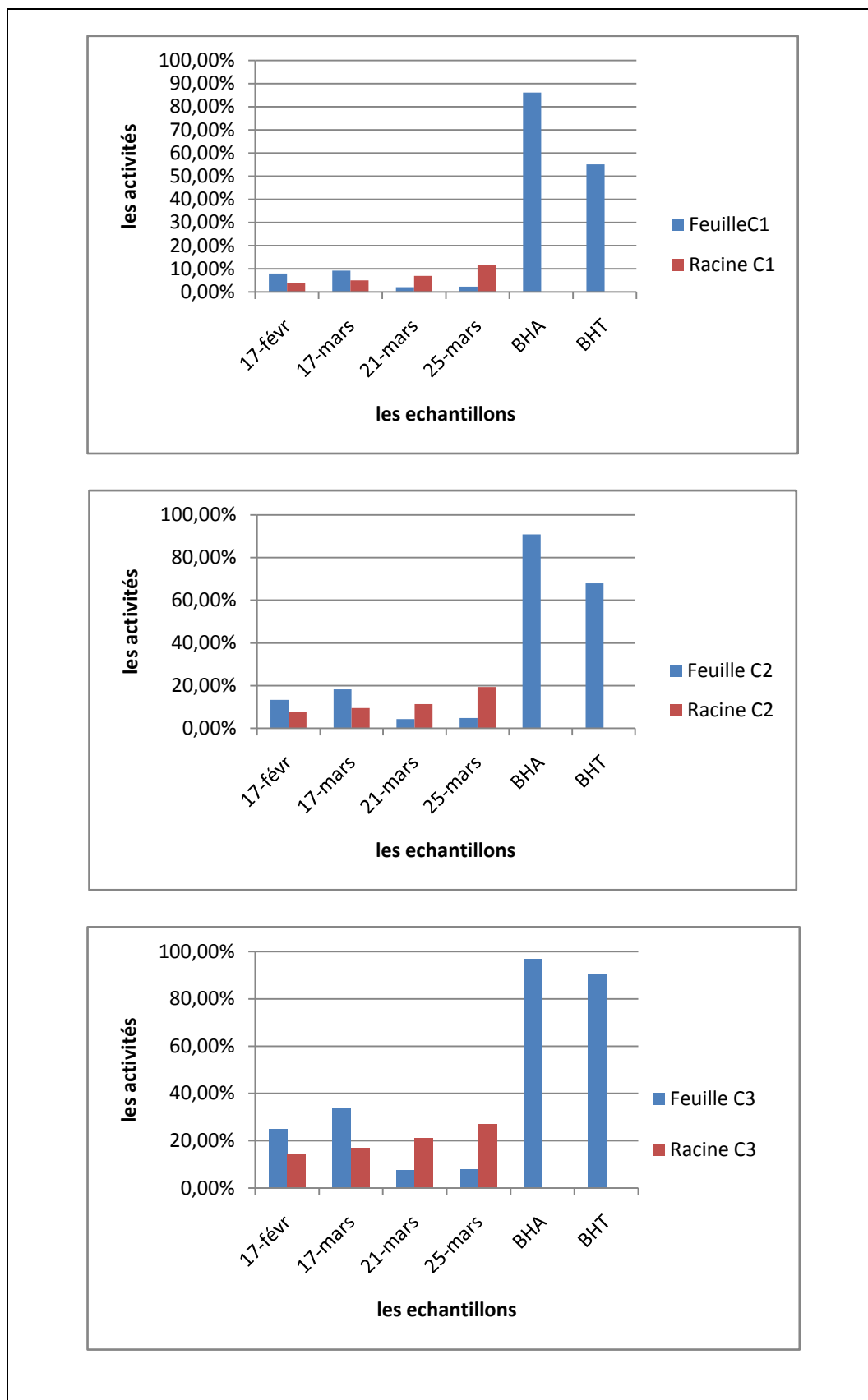


Figure 31 : L'histogramme de l'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode DPPH sur les huiles essentielle de *Thapsia Garganica L.*

On constate que l'activité du piégeage du radical DPPH, augmente avec l'augmentation de la concentration de l'huile essentielle.

L'analyse du tableau et de la figure des résultats montre que l'activité des références BHT, BHA est beaucoup plus importante que celle des huiles essentielles des feuilles et des huiles essentielles des racines des différentes récoltes, elle est de 96,84% pour le BHA, et 90,36% pour le BHT contre 24,76% et 33,43% pour les HE des feuilles des récoltes de 17/02 et 17/03 respectivement. Cela peut être justifié par le fait que l'HE se présente sous forme d'un mélange de composé (actif tel que les terpènes oxygénés et les composés inactifs tel que les hydrocarbures), alors que les références sont des composés de synthèse pur.

D'autre part on remarque que l'activité des HE des feuilles et celle des racines de cette plante, varie selon la période de récolte. Nos résultats montrent que l'activité des HE des feuilles dépasse celle des racines presque par le double (24,76%, 33,43% pour les feuilles contre 14,02%, 16,74% pour les racines, dans les récoltes du 17/02 et 17/03 respectivement), alors que l'activité des feuille pour les récoltes 21/03, 25/03 diminue nettement au moment où celle des racines augmente en la dépassant de quatre fois. Cette différence de l'activité entre les différentes parties étudiées à travers les différentes récolte peut être justifiée par l'analyse de la composition chimique des HE.

II.1.2. Les extraits phénoliques

L'application de cette méthode sur nos huiles essentielles a révélé les résultats donnés dans le tableau 10 et présentées dans les figures 32 :

Tableau 10 : les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode DPPH sur les extraits phénoliques de *Thapsia Garganica L.*

| Les extraits phénoliques | | | | | | | |
|--------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|--------|
| | | 17-févr | 17-mars | 21-mars | 25-mars | BHA | BHT |
| C 1 | Feuille | 37,81% | 39,95% | 55,36% | 40,55% | 48,83% | 32,67% |
| | Racine | 23,95% | 31,54% | 40,60% | 29,92% | | |
| C 2 | Feuille | 43,05% | 61,15% | 68,97% | 62,68% | 65,31% | 42,96% |
| | Racine | 36,95% | 49,96% | 55,87% | 44,18% | | |
| C 3 | Feuille | 73,62% | 80,33% | 91,07% | 83,13% | 85,15% | 60,83% |
| | Racine | 50,21% | 57,75% | 63,06% | 56,60% | | |

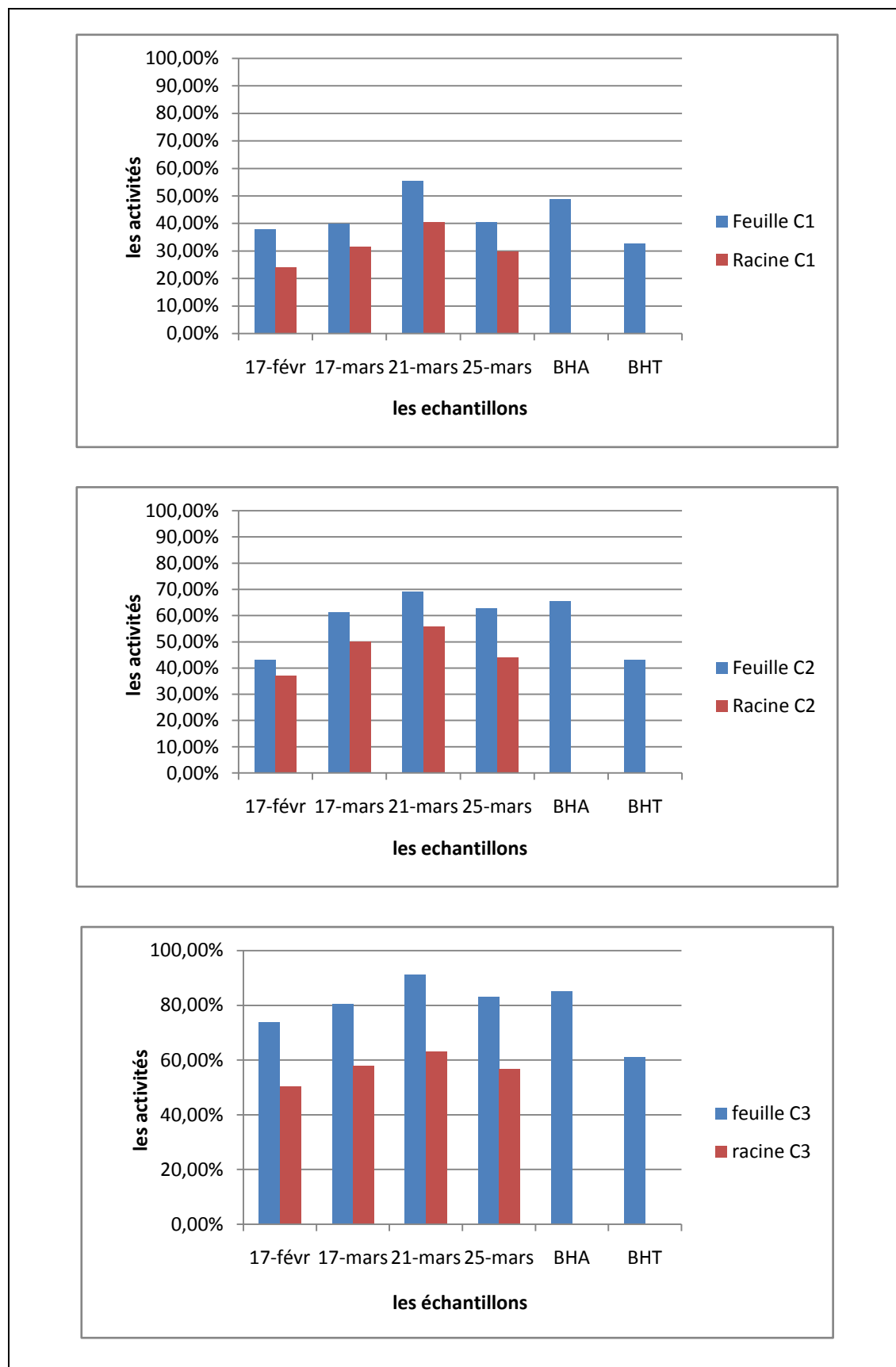


Figure 32 : L'histogramme de l'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode DPPH sur les extraits phénoliques de *Thapsia Garganica L.*

L'analyse du tableau et de la figure récapitulative des résultats de nos extraits montre que l'activité du piégeage des radicaux libres augmente avec l'augmentation de la concentration des extraits. Aussi, on remarque que l'activité des extraits feuilles est meilleure que celle des racines dans les différentes récoltes. Cette activité, varie d'une récolte à une autre, par exemple: pour les EXT-F l'activité est de 73,62% ; 80,33% contre 50,21% ; 57,75% ; pour les EXT-R des récoltes 17/02 ; 17/03 respectivement). Cette différence est due probablement à la différence du taux des polyphénols dans les différentes parties de la plante.

D'autre part, on remarque que l'activité de ces extraits par rapport à celle des antioxydants de synthèse varie selon les récoltes et les parties de la plante étudiées, où l'activité des extraits des feuilles dépasse celle de BHT à toutes périodes (ex : 60,83% pour BHT contre 73,62% EXT-F 17/02), mais ne dépasse pas celle du BHA (85,15%) qu'au 21/03 (91,07%). pour les extraits des racines, leur activité est dans toutes les récoltes inférieure à celle du BHA, mais elle dépasse l'activité du BHT à la récolte 21/03.

II.1.3. Huiles essentielle et extrait phénolique

La comparaison des résultats de l'évaluation de l'activité des huiles essentielles par rapport à celle des extraits phénoliques à la même concentration qui est de 0.1mg/ml, sont représentés dans la figure suivante :

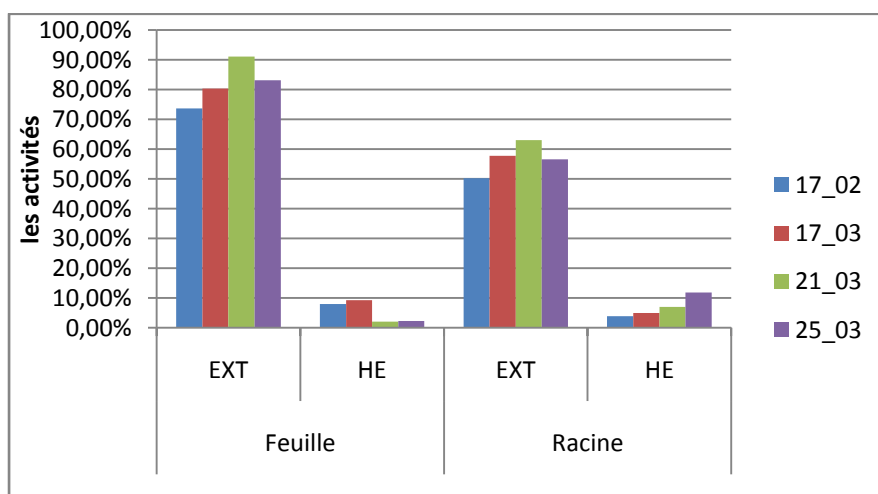


Figure 33 : L'histogramme de l'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode DPPH sur les extraits phénoliques de *Thapsia Garganica L.*

Cette figure montre clairement la différence significative entre l'activité des huiles essentielles et celle des extraits, où l'activité des extraits elle est beaucoup plus importante que celle des huiles essentielles dans les deux parties de la plante et dans les différentes récoltes. Cette forte activité est due à la richesse de ces extraits en composés phénoliques, autrement dit : les extraits méthanoliques en subissent une bonne purification de ces composés phénoliques, ces derniers connus par leur forte activité antiradicalaire à piéger les radicaux libres selon le mécanisme présenté dans la figure. Par ailleurs, les HE sont constituées d'un mélange de composés actifs et de composés inactifs ainsi leur faible teneur en composés phénoliques ce qui les rend moins actifs.



Figure 34 : mécanisme expliquant l'activité antiradicalaire des phénols.

II.2. La méthode du blanchiment du β -carotène

Le principe de cette méthode est d'inhiber l'oxydation et le blanchiment de la molécule du β -carotène par les produits de décomposition de l'acide linoléique au cours de l'expérience. Cette inhibition doit être assurée par nos huiles essentielles et extraits phénoliques, si ce n'est pas le cas alors ces derniers n'ont pas une activité antioxydante.

II.2.1. Huiles essentielles

Cette méthode a été appliquée sur les HE avec un suivi de perte de la couleur du β -carotène pendant 48 heures, le suivi de cette perte est estimé par la mesure de l'absorbance des échantillons par spectrophotomètre à une longueur d'onde de 490 nm. L'ensemble de ces absorbances sont illustrées dans la figure 35 :

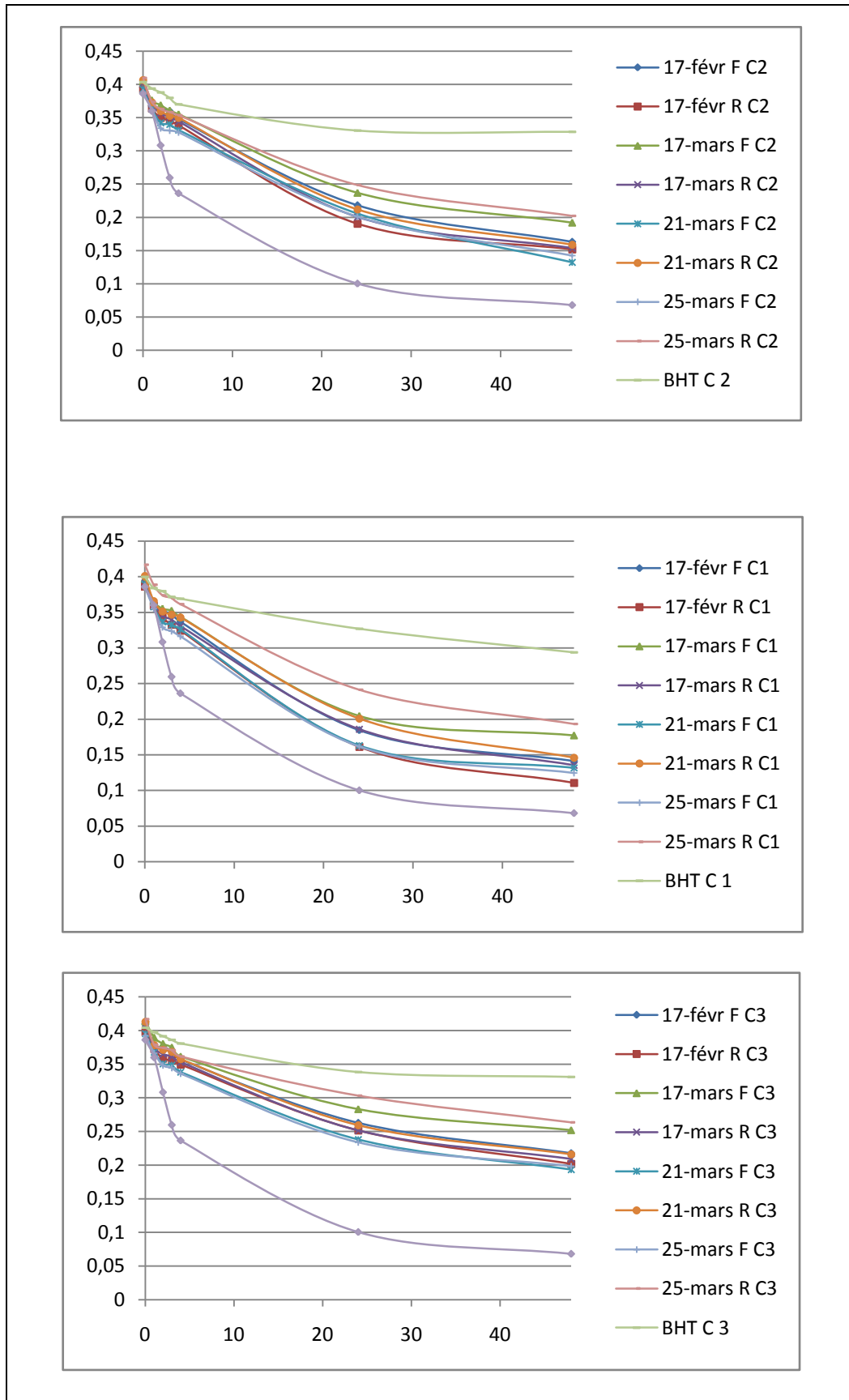


Figure 35 : l'évaluation de la dégradation de la couleur de du β -carotène en présences des huiles essentielles pondant 48 heures.

Le suivi de l'absorbance de B-carotène en présence de nos huiles essentielles ou du référence BHT ou leur absence, a donné des courbes qui ont une tendance de s'incliner et de tendre vers des faible valeurs ou qui se stagne l'égerment.

L'observation de ces courbes, est marquée par la surface qui sépare celle du contrôle par rapport à celles des HE. Cette séparation est due aux faibles valeurs sur les qu'elle est fondée la courbe du contrôle se qui signifie pour notre méthode que la β -carotène pour cette échantillon elle s'est beaucoup et rapidement dégradée contrairement aux autres échantillons qui ont porté une certaine protection pour cette molécules et autrement dit les nos huiles essentielle ils ont une activité antioxydante non négligeable.

En autre, en comparant par rapport à BHT, on constatera que ce dernier à porté plus de protection grâce à sont activité qui est plus importante que tout les HE des différentes récoltes et des différentes partie de la plante.

II.2.2. Les extraits :

Comme pour les HE, cette méthode a été appliquée aussi sur les extrait phénolique dont le but de mettre en évidence la protection de la β -carotène contre l'oxydation avec un suivi de perte de sa couleur pendant 48 heures, ce suivi est estimé par la mesure de l'absorbance des échenillons par spectrophotomètre à une longueur d'onde de 490nm. L'ensemble de ces absorbance sont données dans le et illustrées dans la figure 36 :

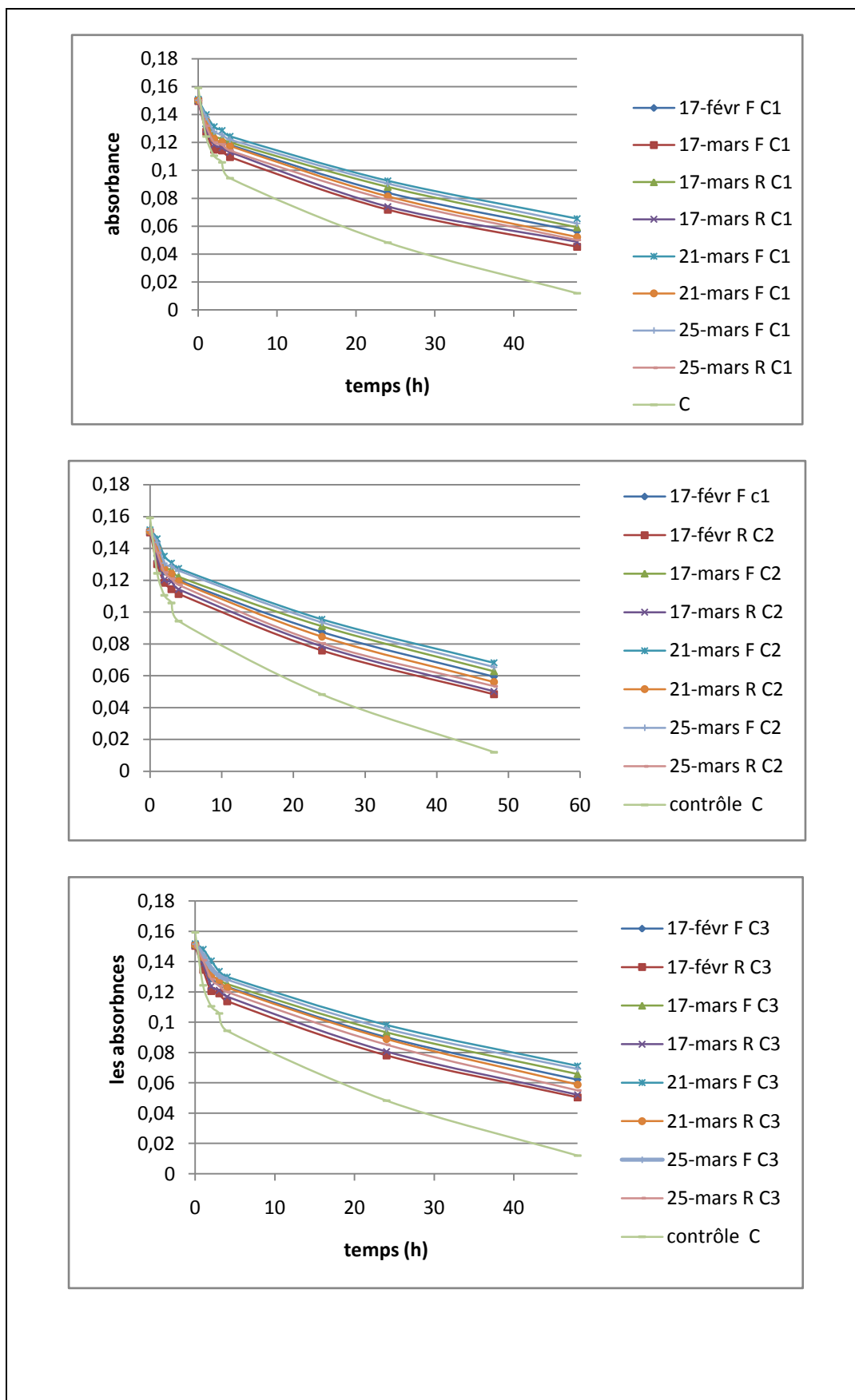


Figure 36 : l'évaluation de la dégradation de la couleur de du β -carotène en présences des extraits phénoliques pendant 48 heures.

La figure montre qu'en présence ou en absences des EXT, l'absorbance diminue au cours du temps. Les courbes réalisées à partir de ces absorbances présente une surface de séparation importante entre celle du contrôle et celles des EXT.

Cette séparation signifie que la β -carotène est rapidement et complètement dégradée dans le contrôle négatif contrairement aux autres échantillons qui ont inhibé potentiellement sa dégradation grâce à l'importance de leur activité antioxydante.

II.2.3. Les activités relatives de b-carotène :

Dans le but de savoir le degré d'activité antioxydante de nos HE par rapport à l'activité antioxydante du BHT, on a calculé l'activité relative. L'ensemble des résultats obtenu pour les différentes concentrations sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau 11 : les résultats de l'activité relative des huiles essentielles.

| | | les activités % | | |
|-------|------|-----------------|--------|--------|
| | | C1 | C2 | C3 |
| 17_02 | F C1 | 48,13% | 58,46% | 76,14% |
| | R C1 | 37,71% | 44,07% | 63,23% |
| 17_03 | F C1 | 60,35% | 64,55% | 79,62% |
| | R C1 | 46,09% | 48,33% | 65,77% |
| 21_03 | F C1 | 40,83% | 46,32% | 59,26% |
| | R C1 | 49,76% | 53,63% | 66,89% |
| 25_03 | F C1 | 40,34% | 43,37% | 57,02% |
| | R C1 | 56,76% | 60,31% | 62,42% |

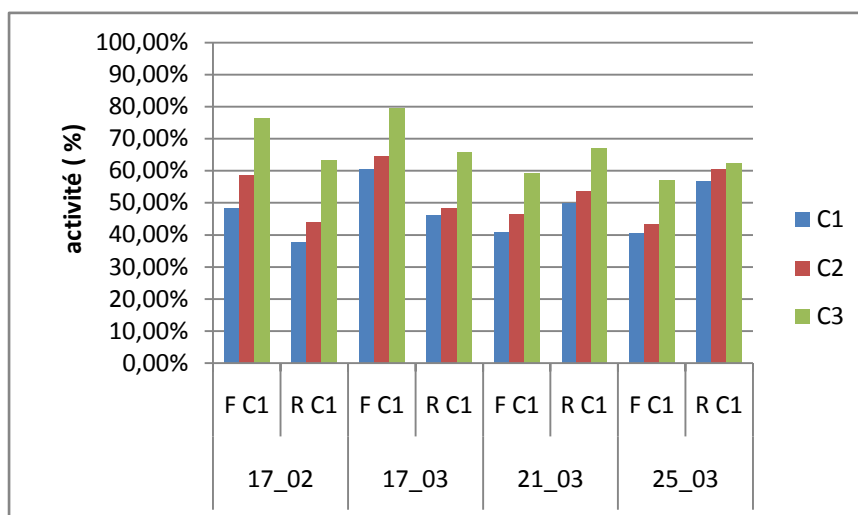


Figure 37: les histogrammes représentant l'activité relative des huiles essentielles.

La figure montre que l'activité relative augmente avec l'augmentation des concentrations des huiles essentielles.

En comparant entre les différents échantillons des HE, on constate que l'activité relative varie d'un échantillon à un autre. On trouve que l'activité des HE feuilles est meilleure que celle des racines dans les deux premières récoltes (17 févr. et 17 mars) après ces deux récoltes les HE des racines deviennent plus actives.

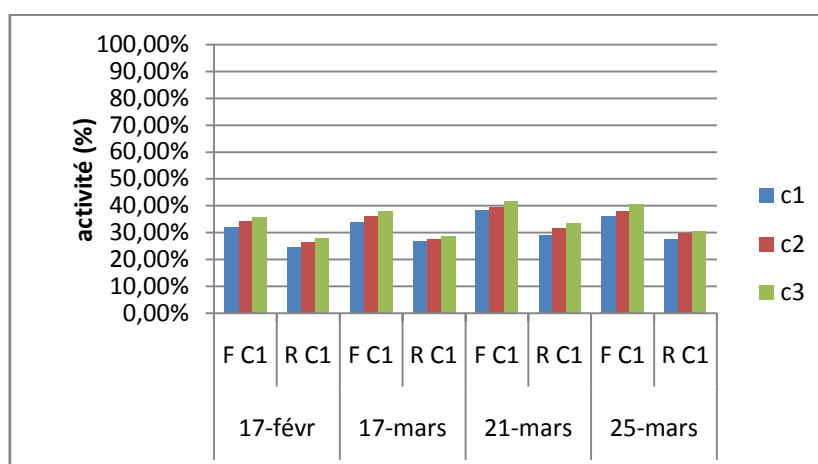
A partir de cette analyse, on déduit que la meilleure activité des HE des feuilles est atteinte à la récolte du 17 mars donc en fin d'hiver puis elles perdent de l'importance de leur activité, par contre l'activité des HE des racines s'améliore à l'arrivée du printemps leur activité se qui leur permet d'être plus rentables que les HE feuilles à partir de la récolte du 21 mars.

II.2.4. L'activité antioxydante des extraits :

Pour l'estimation de la capacité d'inhiber le blanchiment de β -carotène des extraits phénoliques, on a calculé leur activité antioxydante par la loi citée précédemment dans la partie matérielle et méthodes. L'ensemble des résultats obtenus pour les différentes concentrations sont représentés dans les tableaux suivants :

Tableau 12 : les différents résultats de l'activité antioxydante.

| les extraits | | | | |
|--------------|------|--------|--------|--------|
| | | C1 | C2 | C3 |
| 17-févr | F C1 | 32,15% | 34,11% | 35,55% |
| | R C1 | 24,40% | 26,36% | 27,66% |
| 17-mars | F C1 | 33,96% | 35,99% | 37,94% |
| | R C1 | 26,72% | 27,37% | 28,60% |
| 21-mars | F C1 | 38,16% | 39,54% | 41,56% |
| | R C1 | 29,04% | 31,43% | 33,38% |
| 25-mars | F C1 | 35,99% | 37,80% | 40,41% |
| | R C1 | 27,59% | 29,62% | 30,63% |

**Figure 38 :** les histogrammes représentant l'activité des extraits phénolique.

Comme pour toutes les méthodes l'activité antioxydante est proportionnellement relative à la concentration des extraits.

On observant cette figure on remarque que l'activité des EXT-feuille est supérieur à celle des EXT-racine dans toutes les récoltes qu'elle que soit la concentration (ex : 3396% pour les EXT-feuilles contre 26.72% pour les EXT-racine à la récolte du 17 mars).

La plus faible activité est offerte par les EXT des feuilles et des racines dans la récolte du 17 févr. avec 32.15% et 24.40% respectivement et la récolte qui représente une bonne activité est celle du 21 mars avec une activité de 38.16% et 28.04% EXT feuilles et racines.

II.3. La méthode FRAP

Le principe de cette méthode est basée sur la réduction du fer ferrique Fe^{3+} présent dans le complexe ferrocyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ en fer ferreux Fe^{2+} avec virement de la couleur jaune du fer ferrique en couleur bleu vert du fer ferreux.

Cette méthode comme la précédente est réalisées sur les HE et les EXT des feuilles et des racines de *Thapsia Garganica* afin d'évaluer leur capacité à réduire le fer ferrique en fer ferreux.

II.3.1. Huiles essentielles

L'application de cette méthode sur nos huiles essentielles a donnée des résultats présentés sous forme d'absorbance mesurée à 760 nm, ces dernières sont données dans le tableau suivant :

Tableau 13 : les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode FRAP sur les huiles essentielles de *Thapsia Garganica* L.

| | | huile essentielle | | | | | | |
|-----|---------|-------------------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
| | | 17_02 | 17_03 | 21__03 | 25_03 | BHT | BHA | contole |
| C 1 | Feuille | 0,3517 | 1,2561 | 0,9754 | 0,8586 | 1,9061 | 1,8506 | 0,0578 |
| | Racine | 0,1426 | 0,942 | 1,3651 | 1,5772 | | | |
| C 2 | Feuille | 0,7525 | 1,7987 | 1,5536 | 1,1398 | 3,296 | 3,1552 | |
| | Racine | 0,3517 | 1,1295 | 2,2599 | 2,324 | | | |

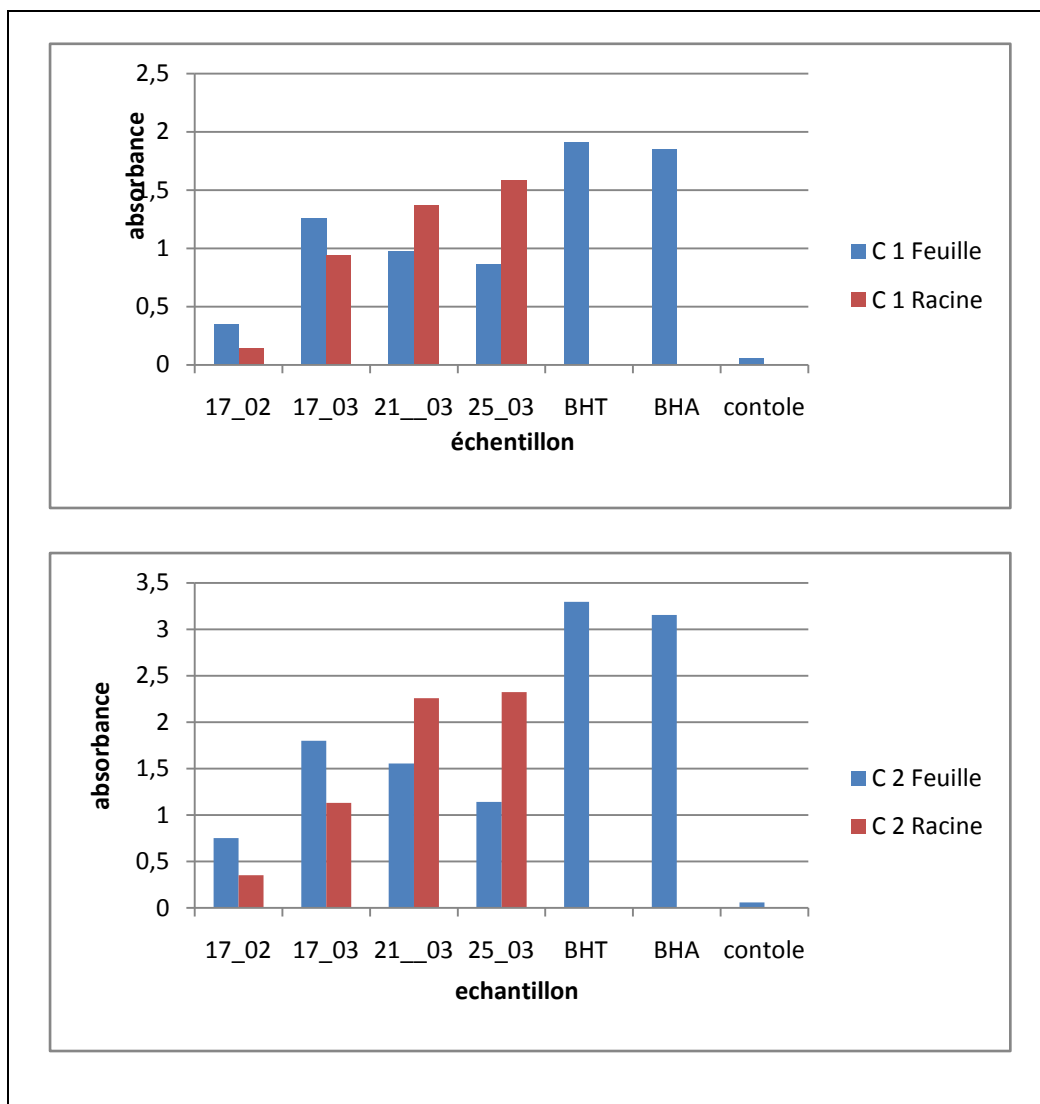


Figure 39 : L'histogramme de l'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode FRAP sur les huiles essentielles de *Thapsia Garganica L.*

Sachant que l'activité augmente avec l'augmentation des absorbance, on peut dire que nos huiles essentielles ont un effet réducteur du fer important car leurs absorbances sont très supérieures à celle du contrôle négatif qui de 0.0578 nm alors que l'échantillon le moins actif et à la plus faible concentration son absorbance est de 0.1426 nm.

D'autre part on remarque que l'absorbance du BHT et celle du BHA est nettement supérieure à celle de nos huiles essentielles et ça comme précédemment cité est due la pureté des antioxydants de synthèse et l'impureté des huiles essentielles.

On constate que l'absorbance des feuilles varie selon les différentes récoltes où elle augmente pendant l'hiver puis elle diminue dès l'arrivée du printemps (depuis 21 mars). Contrairement aux racines, leurs absorbances elles augmentent au fil des récoltes, en passant de 0.3517nm à la récolte du 17-févr. (à C2). Jusqu'à un maximum de 2.324 nm à la récolte du 25 mars. Cette variation des valeurs d'absorbance exprime une activité réductrice du fer des HE des feuilles différente à celle des racines et suivant la période de récolte où on peut dire les HE des feuilles sont plus actives que les HR des racines en hiver (dans les récoltes 17-févr. et 17-mars) et elles deviennent moins actives qu'eux au début du printemps (dans les récoltes 21mars et 25 mars) car dans cette période les HE des feuilles marquent une chute de leur activité.

Cette variation de l'activité entre les récoltes et les parties de la plante revient à la composition chimique des HE que plusieurs facteurs peuvent l'influencer comme le stade de végétation et les facteurs climatiques qui dépendent de la période de la récolte.

II.3.2. Les extraits phénoliques

L'application de cette méthode sur les extraits phénoliques a donné (comme pour les HE) des résultats présentés sous forme d'absorbance mesurée à 760 nm, qui sont donnés dans le tableau N° et convertis en histogramme dans la figure N° :

Tableau 14 : les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode FRAP sur les extraits phénoliques de *Thapsia Garganica L.*

| Extraits phénoliques | | | | | | | | |
|----------------------|------------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|----------|
| | | 17_02 | 17_03 | 21_03 | 25_03 | BHT | BHA | contrôle |
| C 1 | Feuille C1 | 0,0928 | 0,14815 | 0,2004 | 0,11 | 0,1052 | 0,1703 | 0,0502 |
| | Racine C1 | 0,0805 | 0,0941 | 0,1105 | 0,0873 | | | |
| C 2 | Feuille C2 | 0,1617 | 0,221 | 0,3065 | 0,1756 | 0,1736 | 0,2548 | |
| | Racine C2 | 0,1241 | 0,1407 | 0,1812 | 0,1399 | | | |
| C 3 | Feuille C3 | 0,3271 | 0,3624 | 0,4463 | 0,3035 | 0,2478 | 0,4228 | |
| | Racine C3 | 0,2023 | 0,2308 | 0,2639 | 0,1544 | | | |

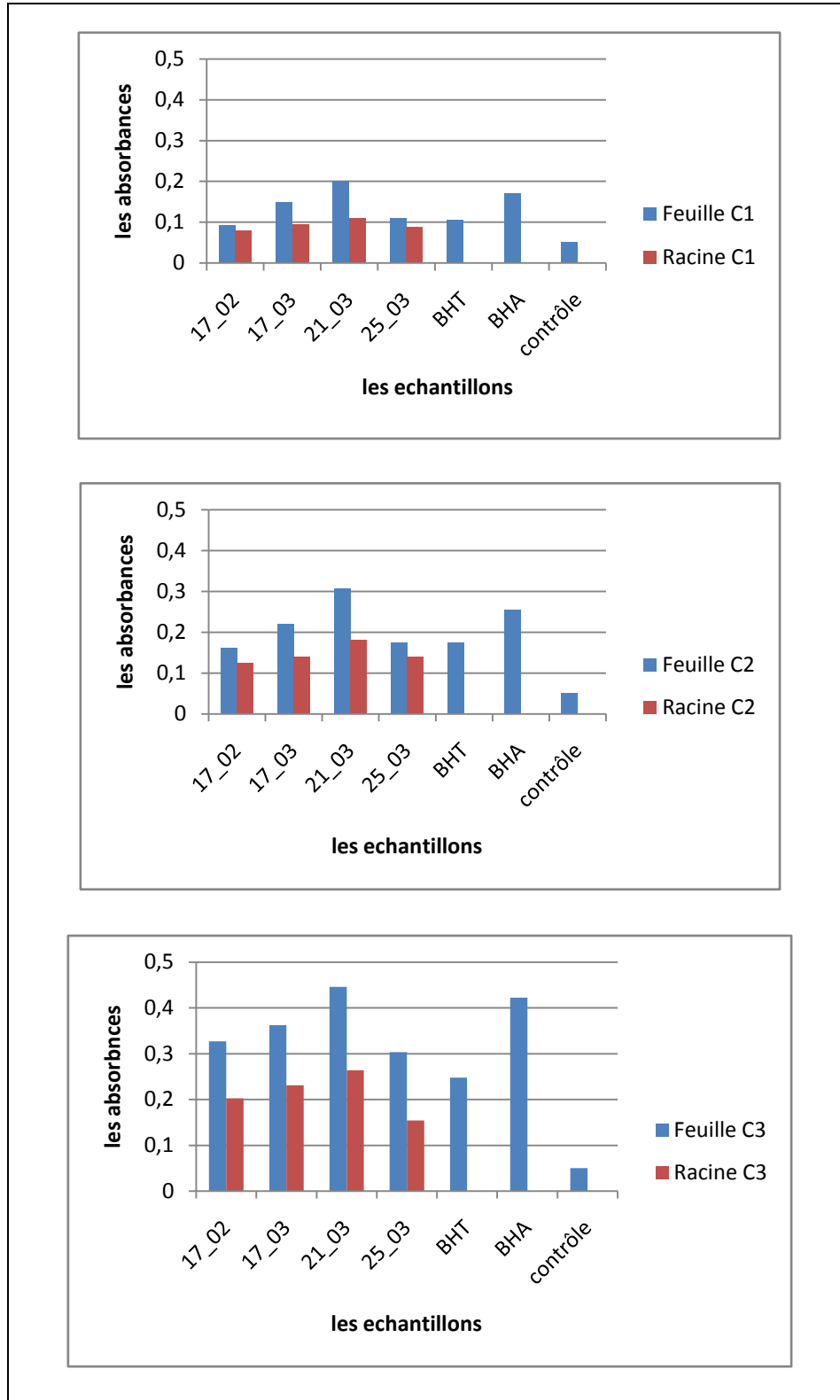


Figure 40 : L'histogramme de l'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode FRAP sur les extraits phénoliques de *Thapsia Garganica*.

La figure montre que l'absorbance des extraits phénoliques est supérieure à celle du contrôle, par exemple : à la concentration C1, l'absorbance de l'échantillon le moins actif est de 0.0805nm pour contrôle elle de 0.0502nm, ce qui veut dire qu'ils ont la capacité de réduire le fer ferrique en fer ferreux. Aussi en comparant entre les différentes concentrations, on dit que cette activité elle croit avec la concentration.

Aussi, la comparaison avec les références montre que pour le BHT, les EXT feuilles sont plus actifs pour toutes les récoltes et pour les racines leurs activités ne le dépassent que par les EXT du 21 mars. Et pour le BHA, il présente une activité plus importante qu'aux EXT feuilles de la récolte du 21 mars, par contre l'activité des racines ne le dépasse est partout inférieur.

Par ailleurs, l'activité de ces extraits phénoliques augment pendant l'hiver en marquant une importance à la récolte du 21 mars, puis une baisse d'activité est signalée à la récolte qui suit. Mais il est important de dire l'activité des racines n'a dépassée jamais l'activité des feuilles

II.3.3. Huiles essentielle et extrait phénolique

Comme dans la méthode du piégeage du radicale DPPH, les extraits phénoliques présente toujours une meilleure activité que les huiles essentielles et qui les dépassent largement.

Cette évaluation de l'activité antioxydante par les trois méthodes : piégeage du radicale DPPH, blanchiment de β -carotène et la méthode FRAP, a donnée des résultats similaires. Pour toutes les méthodes l'extrait phénolique présente une meilleur activité que les huiles essentielles, et que les références BHT et BHA sont plus actifs que les huiles essentielle. Et par rapport aux récoltes la meilleure activité des HE-feuille est obtenue à la récolte du 17 mars et les racines à la récolte du 25 mars, par contre pour les EXT la meilleur activité est obtenue à la récolte du 21 mars pour les deux parties de la plante.

Partie III : Étude de l'activité antimicrobienne :

III.1. L'aromatogramme

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits phénoliques des feuilles et des racines de *Thapsia garganica* L des 4 récoltes a été testés contre sept germes cibles : trois bactéries Gram⁻, deux levures et deux champignons.

Le test de l'activité de l'extrait phénolique a montré que ce dernier ne présente aucune activité antifongique ou antimicrobienne contrairement à l'huile essentielle.

Dans la littérature relative aux huiles essentielles, les résultats de l'aromatogramme sont exprimés exclusivement à partir de la mesure du diamètre des halos d'inhibitions en mm (**Baser & Buchbauer, 2010**). D'après **Ponce et al. (2003)**, la sensibilité à l'huile a été classée par le diamètre des halos d'inhibition : non sensible (-) pour les diamètres moins de 8mm ; sensible (+) pour des diamètres de 8 à 14mm ; très sensible (++) pour des diamètres de 15 à 19mm et extrêmement sensible (+++) pour les diamètres plus de 20mm.

La mesure des diamètres des zones d'inhibitions de croissance des germes ciblés permet d'évaluer cette activité.

Tableau 15 : la variation des diamètres des zones d'inhibitions de la croissance des germes par les huiles essentielles des feuilles et des racines de *Thapsia garganica L* des 4 récoltes.

| Diamètres des zones d'inhibition (cm). | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-------|--------|-----|-------|-----|--------|-----|----------|-----|----------|------|---------|-----|----------|----|
| Germes | | E-coli | | Salmo | | pseudo | | Cand.alb | | Cand.tra | | aspergi | | pénicelu | |
| concentrati | | C1 | C2 | C1 | C2 | C1 | C2 | C1 | C2 | C1 | C2 | C1 | C2 | C1 | C2 |
| FEUILLES | 17/02 | 1,1 | 2,4 | 1,1 | 2,2 | 00 | 2,2 | 1,1 | 2,2 | 00 | 2,3 | 00 | 1,1 | 00 | 00 |
| | | 1,2 | 2,4 | 1,1 | 2,5 | 00 | 2,1 | 1,5 | 2,0 | 00 | 00 | 00 | 1,2 | 00 | 00 |
| | 17/03 | 1,7 | 2,5 | 1,1 | 1,9 | 1,1 | 2,9 | 1,2 | 2,5 | 00 | 2,5 | 00 | 1,3 | 00 | 00 |
| | | 1,5 | 2,5 | 1,2 | 1,7 | 00 | 2,3 | 1,5 | 2,6 | 00 | 2,4 | 00 | 1,3 | 00 | 00 |
| | 21/03 | 1,2 | 2,5 | 1,4 | 2,0 | 00 | 2,4 | 1,7 | 2,3 | 00 | 2,56 | 00 | 1,2 | 00 | 00 |
| | | 1,2 | 2,2 | 1,0 | 1,9 | 00 | 2,1 | 1,5 | 2,3 | 00 | 2,6 | 00 | 1,4 | 00 | 00 |
| | 25/03 | 1,2 | 2,2 | 00 | 1,9 | 1,1 | 2,2 | 1,7 | 2,6 | 00 | 2,5 | 00 | 1,6 | 00 | 00 |
| | | 1,1 | 2,5 | 00 | 2,0 | 1,2 | 1,9 | 1,5 | 2,6 | 00 | 2,8 | 00 | 1,8 | 00 | 00 |
| RACINES | 17/02 | 00 | 2,2 | 00 | 2,5 | 1,2 | 2,3 | 1,5 | 2,0 | 1,2 | 2,5 | 00 | 1,5 | 00 | 00 |
| | | 00 | 2,3 | 00 | 2,4 | 1,1 | 2,0 | 1,6 | 1,9 | 1,1 | 2,3 | 00 | 1,7 | 00 | 00 |
| | 17/03 | 00 | 2,4 | 00 | 2,2 | 1,3 | 2,4 | 1,6 | 2,9 | 1,2 | 2,4 | 00 | 1,8 | 00 | 00 |
| | | 00 | 2,3 | 00 | 2,4 | 1,1 | 2,4 | 1,7 | 3,2 | 1,4 | 2,1 | 00 | 2,0 | 00 | 00 |
| | 21/03 | 00 | 2,5 | 00 | 2,0 | 1,4 | 2,2 | 1,7 | 2,6 | 1,3 | 2,6 | 00 | 2,0 | 00 | 00 |
| | | 00 | 2,5 | 1,1 | 2,1 | 1,1 | 2,6 | 1,5 | 2,4 | 1,1 | 2,5 | 00 | 2,3 | 00 | 00 |
| | 25/03 | 00 | 2,6 | 00 | 2,5 | 1,6 | 2,6 | 2,1 | 3,1 | 1,6 | 2,5 | 00 | 2,2 | 00 | 00 |
| | | 1,2 | 2,4 | 00 | 2,9 | 1,6 | 2,6 | 2,4 | 2,9 | 1,4 | 2,3 | 00 | 2,0 | 00 | 00 |

III.1.1. Activité antibactérienne des huiles essentielles :

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

Les aromatogrammes obtenus sont regroupés dans la figure :

Les valeurs des diamètres des zones d'inhibitions de la croissance de ses germes est donnée dans le tableau représentée Ci-dessous :

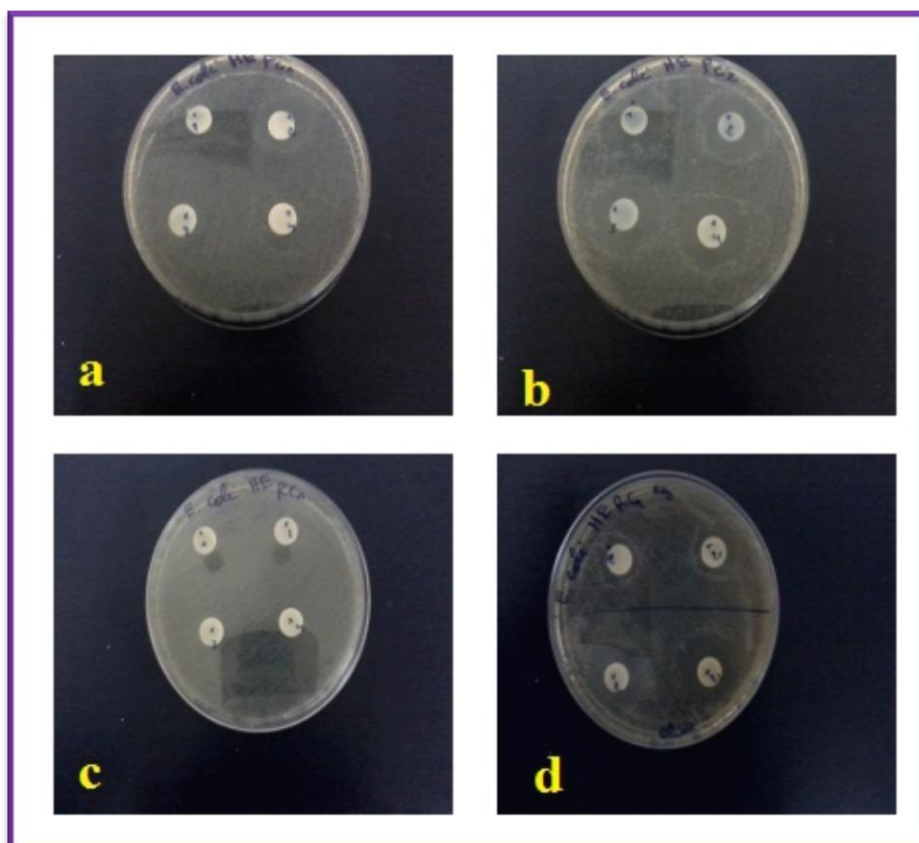


Figure 40 : Photos montrant l'effet des huiles essentielles de thapsia garganica L des 04 récolte, des sur Echirichia coli.

D'une façon générale nos huiles essentielles présentent une bonne activité en ver les bactéries à la concentration (dont ont posé 70 μ l d'une solution mère de 12.5 mg/ml), à la concentration faible (30 μ l d'une solution mère de 50mg/ml) y a absence d'activité d'E-coli et Pseudomonas pour les HE des racines. On remarque aussi que les huiles essentielles des racines et des feuilles on une activité semblable est extrêmement sensible.

La comparaison de l'activité antibactérienne des huiles essentielles des 04 récoltes

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.

III.1.2. Activité antifongiques :

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

Les aromatoigrammes obtenus sont regroupés dans la figure

Les valeurs des diamètres des zones d'inhibitions de la croissance de ses germes est donnée dans le tableau représentée Ci-dessous :

L'huile essentielle utilisée dans ce test présente une activité 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 *candida albicans* est extrêmement sensible face nos huiles essentielles (feuille-tige, racine), alors que pour la *candida Tropicalis* es a la concentration (C1) y a pas une activité pour les feuilles-tiges et une sensibilité en vair l'huile essentielle des racine est cela pour les 4 récoltes.

On ce qui concerne les champignons nos huiles essentielles ne présente pas d'activité à la concentration C1 sauf pour les HE des racines de 4 récoltes, ou l'*Aspergillus niger* est très sensibles en vair ces dernier.

Alors qu'à la concentration C2 tou nos échantillons sont extrêmement sensible en vaire nos HE sauf pour l'*Aspergillus niger* qui présente une sensible élever en vaire nos HE des feuille-tige.

III.2. Concentration minimale inhibitrice (CMI) :

La détermination de la concentration minimale inhibitrice est réalisée par la méthode de dilution en milieu gélosé, nous avons utilisé 12 germes cibles.

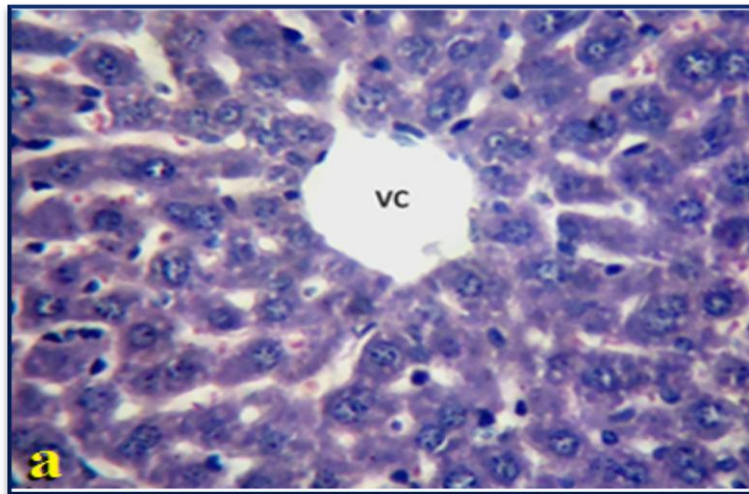
Les concentrations utilisés été tellement faible qu'on ne peut pas déterminer la concentration minimale inhibitrice.

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

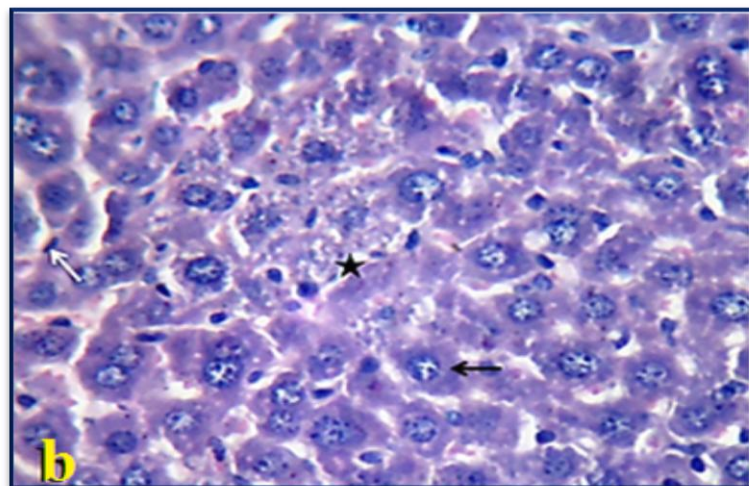
Partie 4 : Histopathologie du parenchyme hépatique

IV.1. Structure du parenchyme hépatique chez la souris témoin

Chez le rat témoin, le parenchyme hépatique est constitué de plusieurs lobules qui possèdent une forme hexagonale centrée par une veinule centrolobulaire. Chaque lobule hépatique est constitué de plusieurs lames hépatocytaires organisées en travées de Remak (figure 42 a). Les hépatocytes de forme polygonale possèdent un cytoplasme dense et un ou deux noyaux arrondis, de taille variable comportant une chromatine. Entre les lames hépatocytaires, des capillaires sinusoides sont bordés par les cellules endothéliales (figure 42 b).



VC : Veine centro-lobulaire.



Flèche noire: Hépatocyte ; Flèche blanche: Noyau de la cellule endothéliale ; Astérie :
Capillaire sinusoides.

Figure 42 : Structure d'un parenchyme hépatique d'une souris témoin. Coloration : HE ;
Grossissement : x400 (a et b).

IV.2. Structure du parenchyme hépatique chez les souris traitées

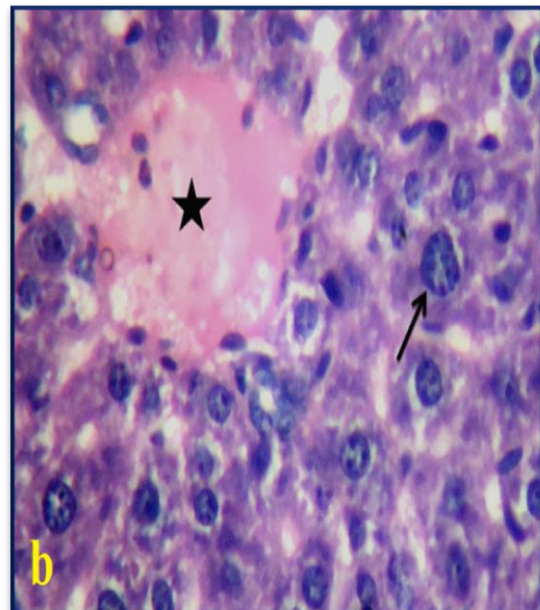
IV.2.1. Chez les souris traitées par l'huile essentielle des feuilles des trois récoltes :

Chez les souris traitées par l'huile essentielle des feuilles récoltée le 17 février et le 21 mars et 25 mars, pendant 10 jours, le parenchyme hépatique présente des altérations structurales plus ou moins importantes. Le parenchyme présente une organisation structurale générale normale avec des lames hépatocytaires moins individualisées. Certaines cellules nécrosées sont marquées par un noyau rétréci possédant une chromatine condensée (Figure 43). Les veines centrolobulaires deviennent dilatées présentant une congestion sanguine bien nette (figure 43 b et 43 a et b) et infiltration des cellules mononucléaires (figure 45 a). Le noyau de quelques hépatocytes devient très volumineux occupant tout l'espace cellulaire (Figure 43 c). La majorité des hépatocytes de la récolte 25 présente un cytoplasme vésiculé (figure 44 a et b).

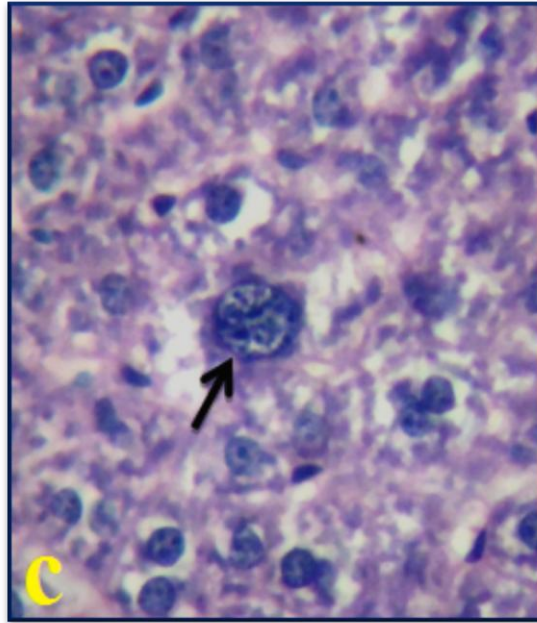
Plusieurs noyaux petits et sombres sont présents dans un cytoplasme vésiculé (Figure 46 a). Les macrophages hépatiques (cellules de Kupfer) sont importants (Figure 46 b).



Cercle : Nécrose.
Flèche noire : Augmentation de la taille de quelques noyaux.

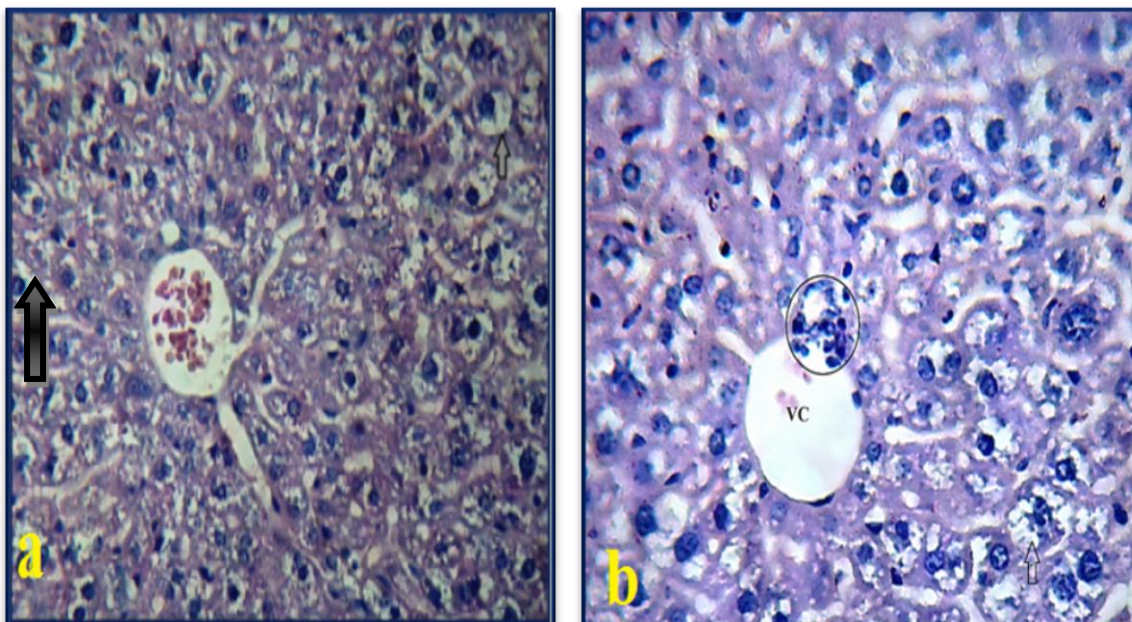


Astéries : Dilatation et congestion sanguine
Flèche noire : Augmentation de la taille de quelques noyaux.



Flèche noire : Augmentation de la taille de quelques noyaux.

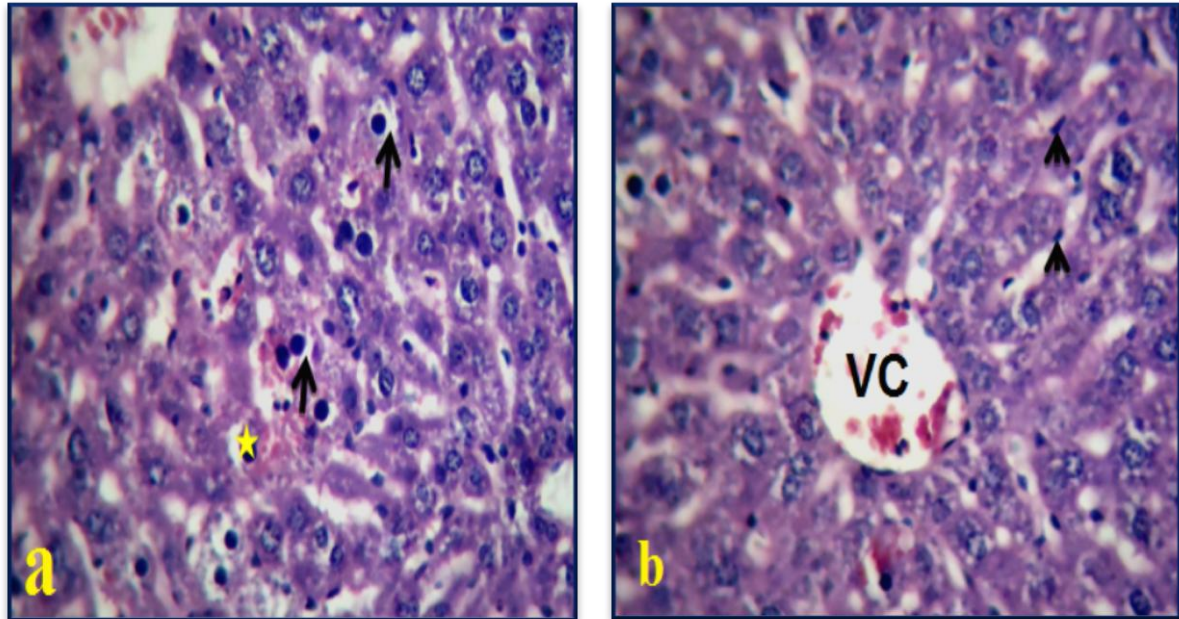
Figure 43 : Structure d'un parenchyme hépatique d'une souris traitée par l'huile essentielle des feuilles de *Thapsia garganica* L récoltées du 17 février Coloration : HE ; Grossissement : x400 (a, b et c).



Flèches : Cytoplasme vésiculé

Cercle : Infiltration cellulaire.

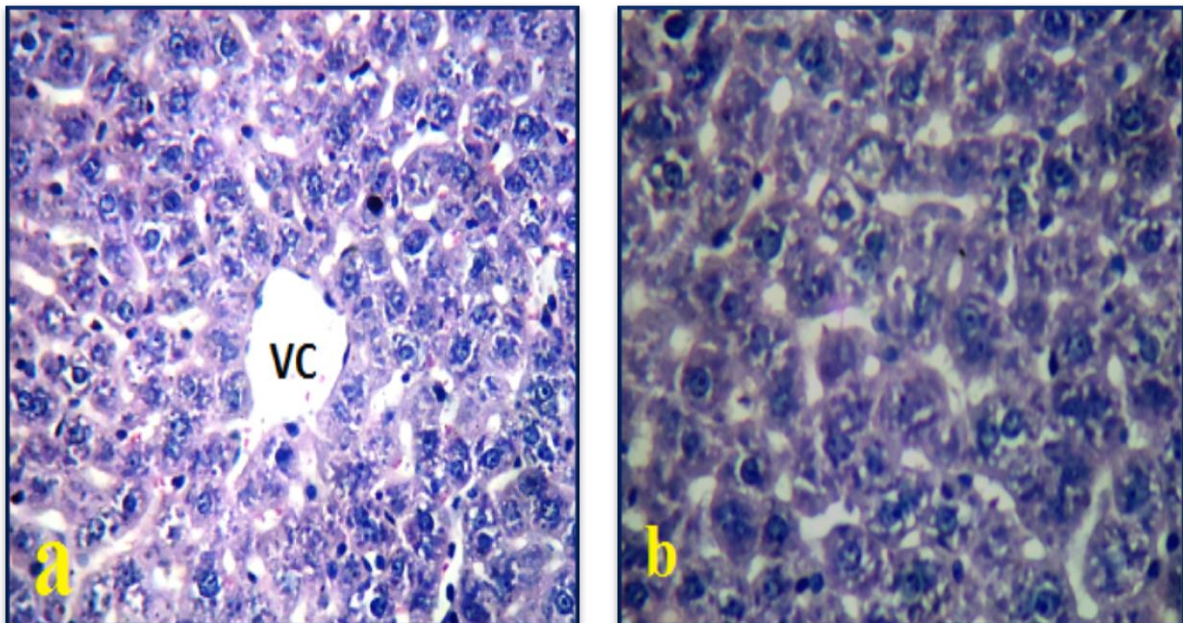
Figure 44: Structure d'un parenchyme hépatique d'une souris traitée par l'huile essentielle de feuilles de *Thapsia garganica* récoltées du 25/03 Coloration : HE ; Grossissement : x400 (a et b).



Flèches : Augmentation du nombre de noyaux des cellules de Kuper.

VC : Veine centro-lobulaire : dilatée avec présence des cellules inflammatoires infiltrantes.

Figure 45 : Structure d'un parenchyme hépatique d'une souris traitée par l'huile essentielle des feuilles de *Thapsia garganica* récoltées le 21 mars Coloration : HE ; Grossissement : x400 (a et b).



VC : Veine Centro-lobulaire.

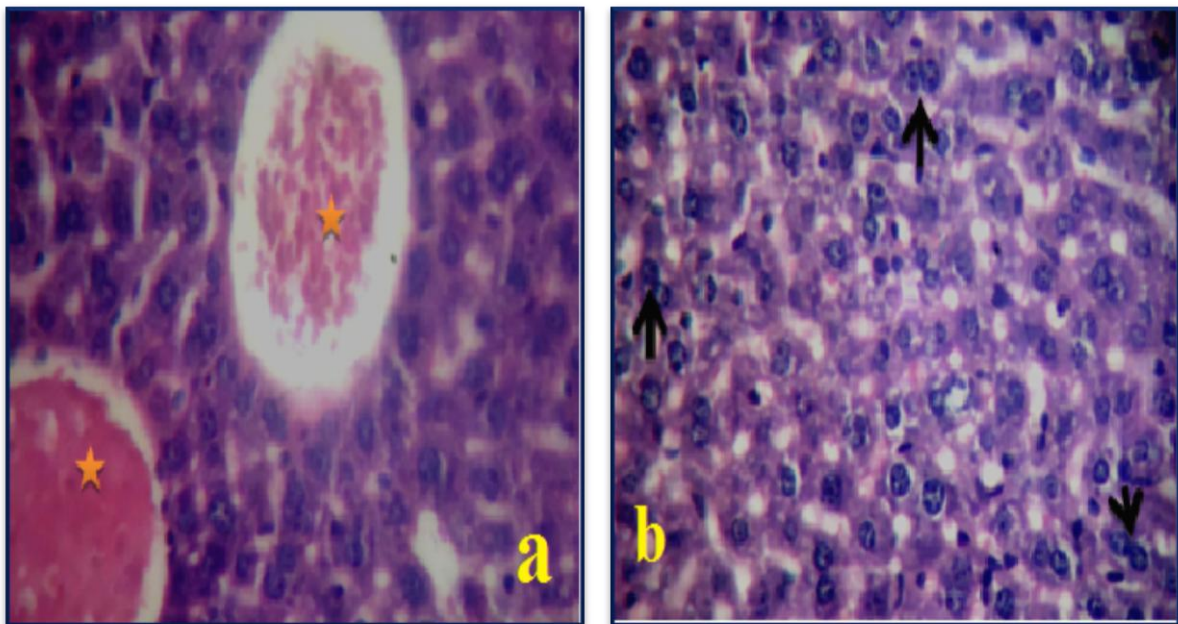
Le parenchyme ne montre pas des altérations structurales.

Figure 46 : Structure d'un parenchyme hépatique d'une souris traitée par l'huile essentielle de feuilles de *Thapsia garganica* récoltées le 21 mars Coloration : HE ; Grossissement : x400 (a et b).

IV.2.2. Chez les souris traitées par l'huile essentielle des racines des trois récoltes

Le traitement par l'huile essentielle des racines récoltée le 17 février, pendant 10 jours, semble entraîner un effet néfaste sur la structure du parenchyme hépatique. Les veines deviennent très dilatées en présentant une importante congestion sanguine (Figure 47 a). Les hépatocytes binucléés augmentent en nombre (Figure 47 b). Des foyers de nécroses sont fréquents dans le parenchyme (Figure 48 a). La congestion sanguine est observée aux niveaux des veines et des capillaires sinusoides (Figure 48 b).

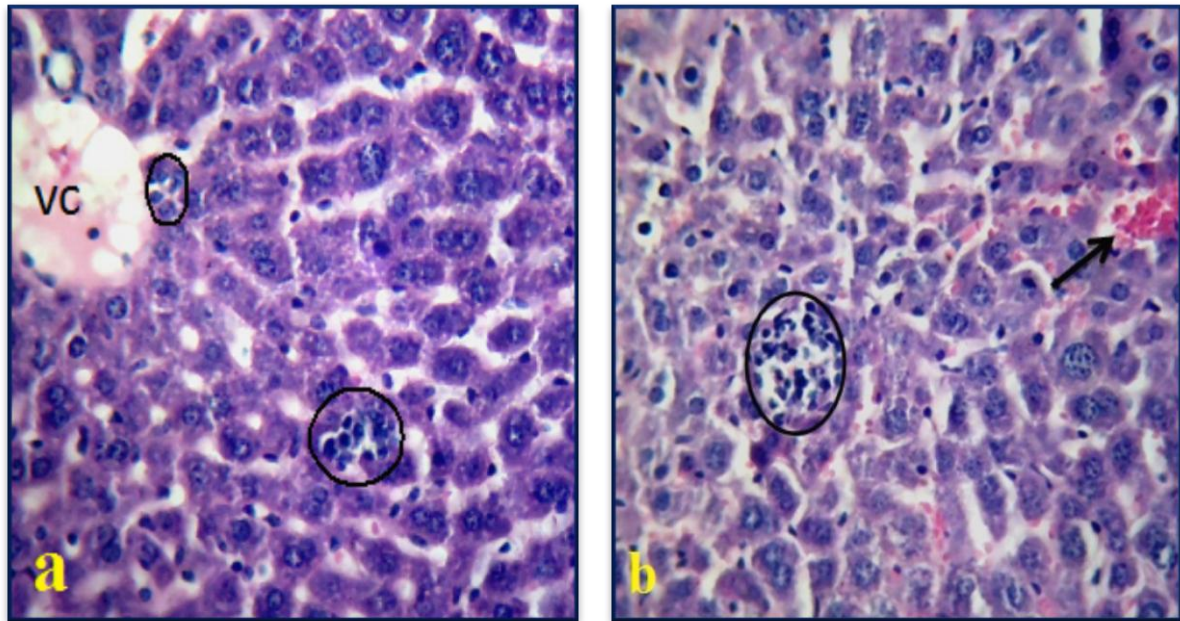
Par ailleurs, le parenchyme hépatique des souris traitées par les récoltes du 21 et 25 mars n'ont pas montré des altérations structurales. Les hépatocytes sont organisées sous forme de lames autour de la veine. Elles possèdent un cytoplasme granuleux non vésiculé et un ou deux noyaux arrondis avec une chromatine décondensée (figure 49 et 50).



Astérie : Dilatation des capillaires sinusoides et congestion sanguine.

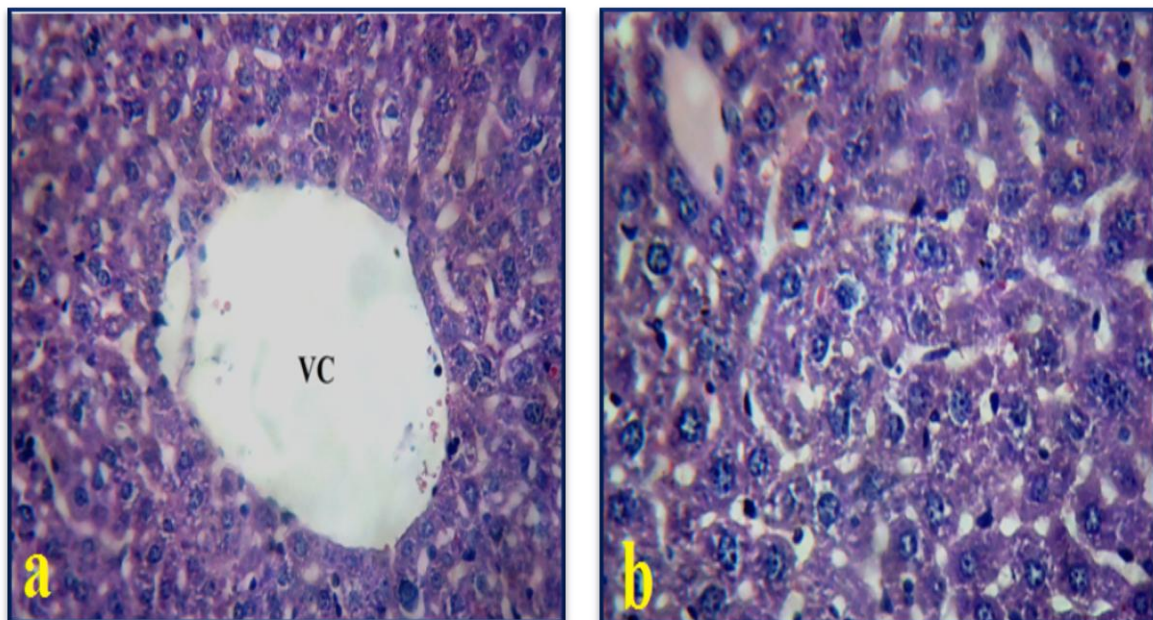
Flèches : Augmentation de nombre des hépatocytes binucléés.

Figure 47 : Structure d'un parenchyme hépatique d'une souris traitée par l'huile essentielle des racines de *Thapsia garganica* récoltées le 17 février. Coloration : HE ; Grossissement : x400 (a et b).



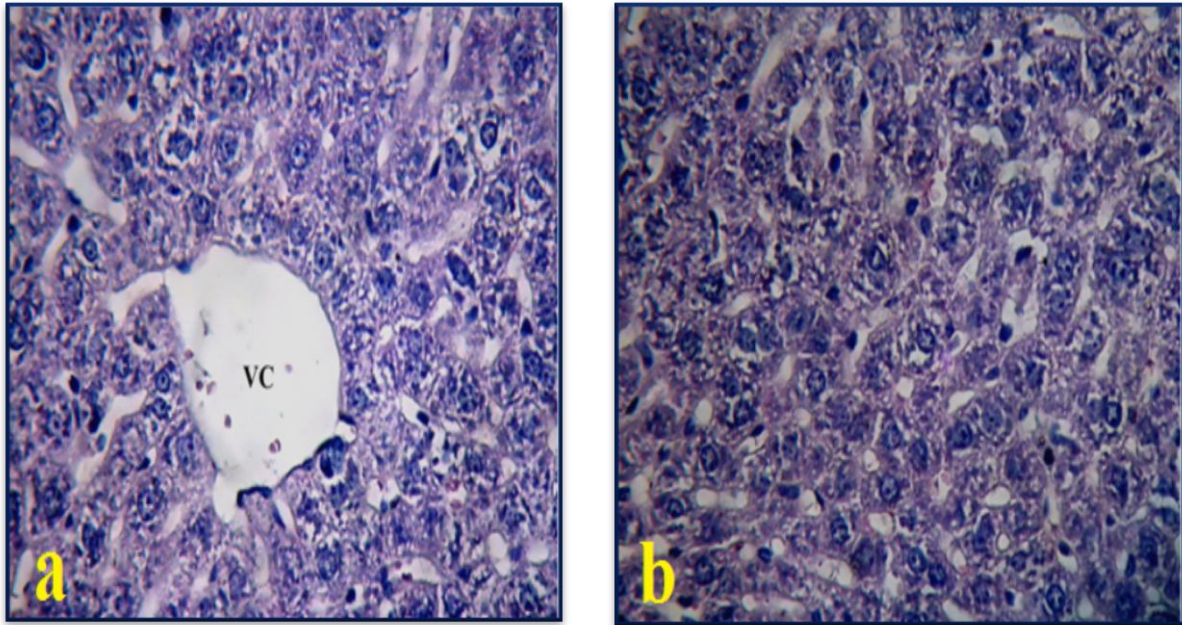
Cercles : Infiltrations locales des cellules mononucléaires ; Flèche : Congestion sanguine.

Figure 48 : Structure d'un parenchyme hépatique d'une souris traitée par l'huile essentielle de racines de *Thapsia garganica* récoltées le 17 février Coloration : HE ; Grossissement : x400 (a et b).



VC : Veine centrolobulaire.

Figure 49 : Structure d'un parenchyme hépatique d'une souris traitée par l'huile des racines de *Thapsia garganica* récoltées le 25 mars Coloration : HématoE ; Grossissement : x400 (a et b).

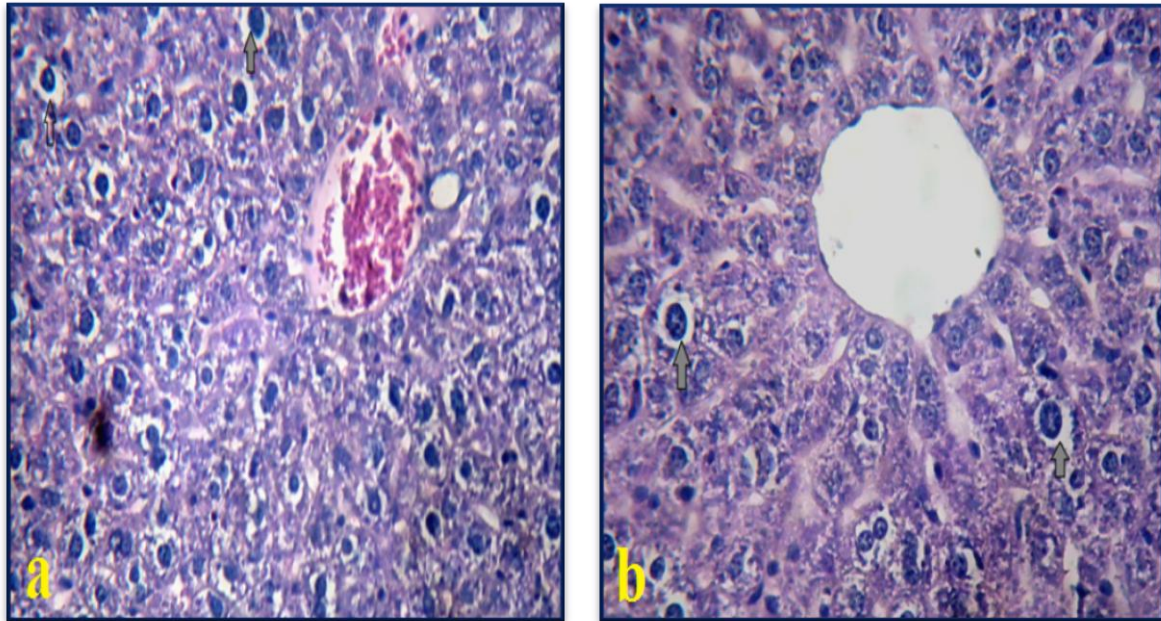


VC : Veine centolobulaire.

Figure 50 : Structure d'un parenchyme hépatique d'une souris traitée par l'huile de racines de *Thapsia garganica L* récoltées du 21 mars Coloration : HE ; Grossissement : x400 (a et b).

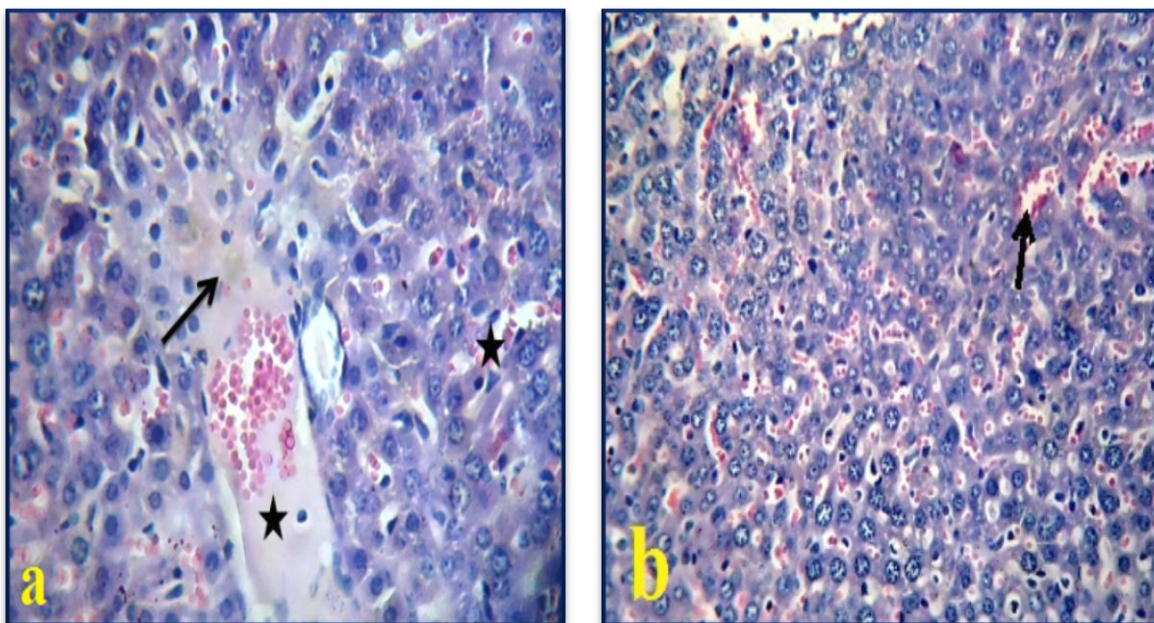
IV.2.3. Chez les souris traitées par l'extrait des feuilles des trois récoltes

Les observations en microscopie photonique révèlent quelques foyers inflammatoires dans le parenchyme hépatiques des souris traitées par l'extrait des feuilles récoltées le 17 février, 21 mars et 25 mars. Ces foyers sont distingués par la congestion sanguine au niveau des veines centro-lobulaires (figures 52 b) et des capillaires sinusoides qui sont dilatées (figure 53 a). Des nécroses sont présentées sous forme d'agrégats au niveau du parenchyme hépatique (figure 52 a).



Flèches : Cellules vésiculées avec un noyau volumineux.

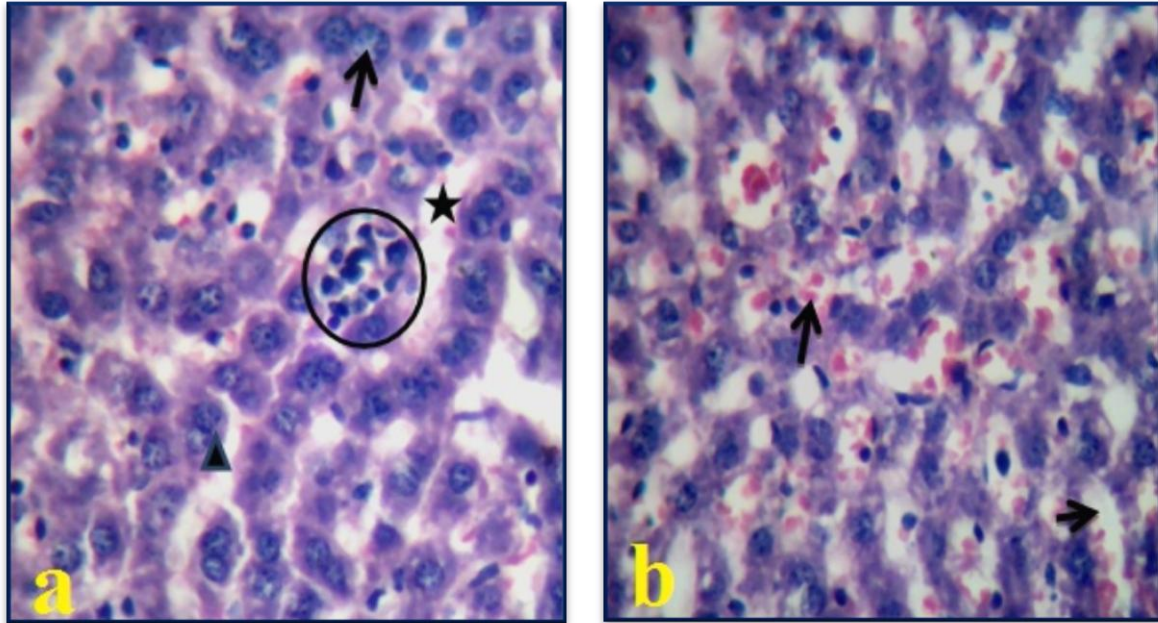
Figure 51 : Structure d'un parenchyme hépatique d'une souris traitée par l'extrait de feuilles de *Thapsia garganica* récoltées le 17 février Coloration : HE ; Grossissement : x400 (a et b avec zoom).



Flèche : Infiltration des cellules mononuclées à proximité de la veine centrolobulaire ; Astéries : Dilatation et présence de la congestion sanguine.

Flèche : Congestion sanguine

Figure 52 : Structure d'un parenchyme hépatique d'une souris traitée par l'extrait de feuilles de *Thapsia garganica* récoltées le 21 mars Coloration : HE ; Grossissement : x400 (a et b).



Cercle : Infiltration cellulaire dans le parenchyme ;

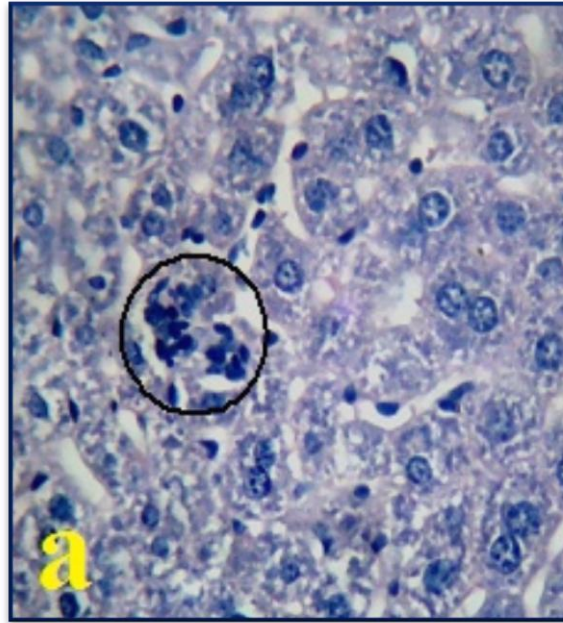
Flèche : Congestion sanguine et dilatation des capillaires sinusoides.

Flèche : Noyau de l'hépatocyte ; Pointe de flèche : Hépatocyte binucléé. Astérie : Capillaire sinusoidé.

Figure 53 : Structure d'un parenchyme hépatique d'une souris traitée par l'extrait de feuilles de *Thapsia garganica* récoltées le 25 mars. Coloration : HE ; Grossissement : x400 (a et b).

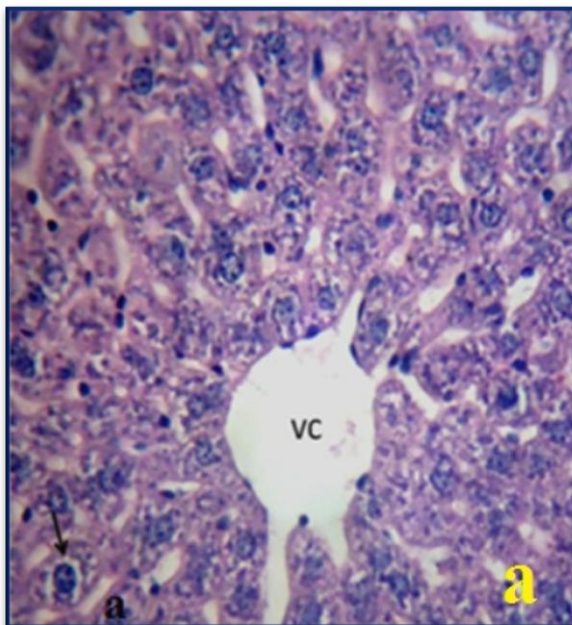
IV.2.4. Chez les souris traitées par l'extrait des racines les trois récoltes

Les observations en microscopie photonique révèlent quelques foyers inflammatoires dans le parenchyme hépatiques des souris traitées par l'extrait des racines récoltés le 17 février '21 mars et 25 mars. Ces foyers sont distingués par la congestion sanguine au niveau des veines centro-lobulaires (figures 55 c, 56 a) et des capillaires sinusoides qui sont dilatées (figure 56 b). Des nécroses sont présentées sous forme d'agrégats au niveau du parenchyme hépatique (figure 55 b).

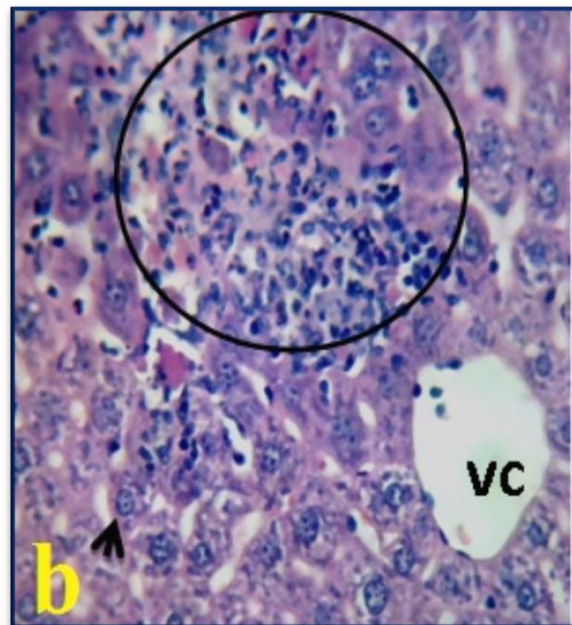


Cercle : Accumulation des cellules mononucléaires à proximité des capillaires sinusoides.

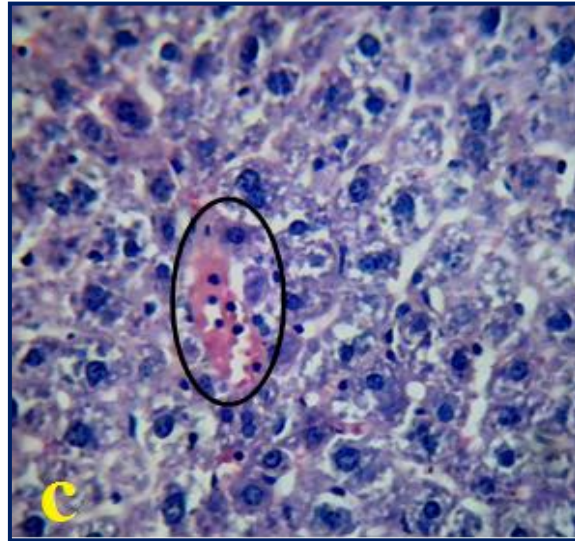
Figure 54 : Structure d'un parenchyme hépatique d'une souris traitée par l'extrait des racines de *Thapsia garganica* récoltées le 17 février Coloration : HE ; Grossissement : x400 (a et b).



Flèche : Hépatocyte normale ;
VC : Veine centrale.

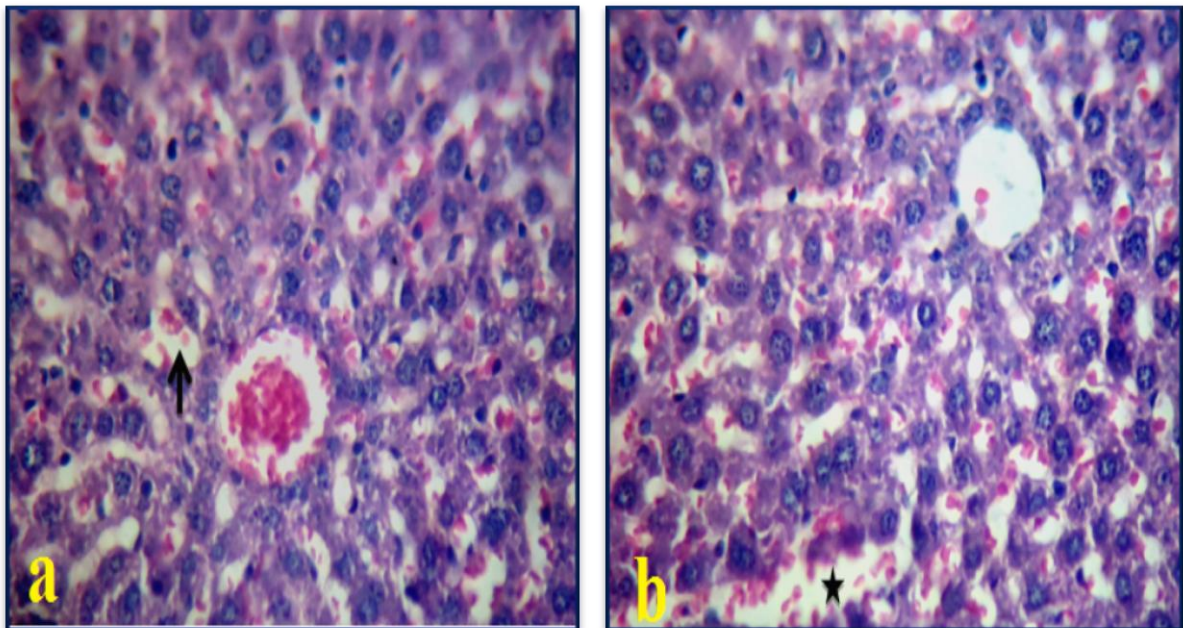


Cercle : un foyer des cellules nécrosées ;
VC : Veine centrale.
Flèche : Hépatocyte normale.



Cercle : Congestion sanguine au sein des capillaires sinusoides.

Figure 55 : Structure d'un parenchyme hépatique d'une souris traitée par l'extrait de racines de *Thapsia garganica* récoltées le 21 mars. **a : Parenchyme sain ; b : Parenchyme présente des cellules nécrosées ; c : Présence de congestion sanguine.** Coloration : HE ; Grossissement : x400 (a et b).



Flèche : Congestion sanguine au sein des capillaires sinusoides et veine centrale, Astérie : dilatation des capillaires.

Figure 56 : Structure d'un parenchyme hépatique d'une souris traitée par l'extrait de racines de *Thapsia garganica* récoltées le 25 mars. Coloration : HE ; Grossissement : x400 (a et b).

CONCLUSION

Cette étude a été réalisée dans le but de comprendre l'utilisation de *Thapsia garganica* dans la médecine traditionnelle cette méthode qui est transmise d'une génération à une autre par nos ancêtres, stipule l'utilisation de la partie volatile (huile essentielle) des racines au premier jour du printemps la comparaison des huiles essentielles au fil des récoltes a montré que le rendement des racines est inférieur à celui des feuilles dans cette période ce qui les rend moins rentables mais d'autre part on trouve que l'extrait a une meilleure activité antioxydante que l'HE.

L'activité antioxydante des huiles essentielles des racines augmente et depuis du printemps est dépassée celle de l'HE des feuilles est continue à augmenter.

La discussion de l'activité antimicrobienne montre que l'extrait n'a pas d'activité, contrairement à l'HE qui a une bonne activité antimicrobienne surtout en vers *E.coli* qui est une bactérie multirésistante qui provoque des troubles gastro-entériques.

Le test de toxicité montre que tous les extraits sont toxiques et provoquent des lésions cellulaires au niveau des hépatocytes, l'HE s'avère toxique pour les feuilles-tiges pour toutes les récoltes, alors que celle des racines elle est toxique que pour le 17 février, pour le 21 mars et le 25 mars l'HE n'est pas toxique.

Enfin toutes les activités abordées lors de notre expérimentation ont montré que les HE des racines au 21 mars sont bénéfiques et sans effet toxique.

AMARTI.F, EI AJJOURI.M, GHANMI.M, SATRANI.B, AAFLA, FARAH.A, KHIA.A, GUEDIRA.A, RAHOUTI.M, CHAOUCH.A. Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de *Thymus zygis* du Maroc. Phytothérapie Springer Verlag France Pharmacologie, aromathérapie, 2011

ANESINI.C, FERRARO. GRACIELA E, FILIP.R. Total Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Commercially Available Tea (*Camellia sinensis*) in Argentina, journal of agriculture. And Food Chemistry. 2008, 56, 9225–9229 9225

Anonyme 1 : Techniques de l'ingénieur.

Anonyme 2 : L'ANSM ancien AFSSAPS

Anonyme 3 : Afssaps 2008 Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles.

AOUADI. M. H, DRISS. M. A. Communication écrite. Un Projet de développement Proche de la Nature : l'oléiculture dans l'espace forestier algérien P05.

ATHMENA.S, CHALGHEM.I, KASAAH-LAOUARA.A , LAROULS, et KHEBRI .S . Activité anti-oxydante et anti-microbienne d'extrait de *cuminum cyminum*. L Lebanese Science Journal, Vol. 11, No. 1, 2010 69

APPENDINO.G, PROSPERINI.S, VALDIVA.C, BALLERO.M, COLOMBANO.G, BILLINGTON. R.A, GENAZZANI. A. A, and O. STERNE. J SERCA-Inhibiting Activity of C-19 Terpenolides from *Thapsia garganica* and Their Possible Biogenesis; . *Nat. Prod.* 2005, 68, 1213-1217

BALCHIM.L, 2002).

BAMM.J , DOUIRA.A. les plantes médicinales dans la forêt de l'achach (plateau central, maroc), Acta Botanica Malacitana 27:143 Málaga, 2002

SAHAA.M.R, HASANA.S.M.R, AKTERA.R, HOSSAINA.M.M, ALAMB.M.S, ALAM.M.A, MAZUMDERC BANG.M.E.H . in vitro free radical scavenging activity of methanol extract of the leaves of *mimusopselengilinn*. j. vet. med. (2008). 6 (2): 197–202

BENISTON. NT WS. fleurs d'Algerie, Alger 1984, P263

BEDJOU. F, BOUGOFFA. K and BERRI .Y. XIème Congrès International SFVB, SFERETE et ATERET - Monastir (Tunisie) - 22 au 24 septembre 2010 P06

BEDJOU. F, BERRI .Y, BOUGOFFA. K. Etude de la toxicite de *thapsia garganica in vivo*, Le 2ème Séminaire International sur les Plantes Médicinales SIPM'2, Ouargla, du 19 au 20 Avril 2011 P30

BEKHCHI.C, ABDELOUAHID.D. Les huiles essentielles, Edition office des publications universitaires. 2010

BENSAADA. H , HADJ MEHDI A. CONTRIBUTION A L'ETUDE PHYTOCHIMIQUE ET BIOLOGIQUE D'UNE PLANTE SPONTANNEE «*Ruta montana L*» DE LA REGION Hammam Melouane- Blida .Projet de fin d'études en, vue de l'obtention Du diplôme d'ingénieur d'Etat en agronomie Spécialité : sciences alimentaires . ANNEE UNIVERSITAIRE 2011/2012

BEGUM.J, NAZRUL.M, BHUIYAN.I, UDDIN.J.C, NUZMUL.M. HOQUE and NURAL.M,A.Antimicrobial Activity of Essential Oil from Seeds of *Carum carvi* and Its Composition. Bangladesh J Microbiol, Volume 25, Number 2, December 2008, pp 85-89

BOUROUF.A, LOUAILECHE.H, BEY MOSTEPHA.B et MOUHOUBI.Z.
Activitesantioxydante et anti-radicalaire d'extraits aqueux de quatre herbes aromatiques

BOURKHISS.M, HNACH.M, PAOLINI.J², COSTA.J², FARAH.A et SATRANI. B.
Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, Vol. 79, 2010, p. 141 – 154.
PROPRIÉTÉS antioxydantes et anti-inflammatoires des huiles essentielles des différentes parties de *tetraclinis articulata*(vahl) masters du maroc.

BIOTECHNOL.M .Siphonodictyal B1 from a Marine Sponge Increases Intracellular Calcium Levels Comparable to the Ca²⁺-ATPase (SERCA) Inhibitor Thapsigargin(2010) 12:267–272

BIOCHEM. J. (Printed in Great Britain) Identification and characterization of a kunzeol synthase from *Thapsia garganica*: implications for the biosynthesis of the pharmaceutical thapsigargin (2012) **448**, 261–271

OUTERFAS.K, MEHDADI.Z, LATRECHE.A, HAZEM.Z et BOUREDJA.N
LES TECHNOLOGIES DE LABORATOIRE - 2013, Volume 8, N°31
Quantification de quelques polyphénols de *Marrubium vulgare* L. du mont de Tessala (Algérie occidentale) pendant les deux périodes de végétation et de floraison
Quantification of some polyphenols of *Marrubium vulgare* L. of Tessala mount (western Algeria) at the vegetative and the flowering periods

BRIQ.N, BOUGANDOURA, BENDIMERAD.N.Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Saturejacalaminthasp.Nepeta(L.)* Revue « Nature & Technologie ». B- Sciences Agronomiques et Biologiques, n° 09/ Juin 2013

BRUNETON.J .Plantes toxiques végétaux dangereux pour l'Homme et les animaux, 3^e édition. P111-112. LA Voisier, 2005

BRUNETON.J. Pharmaconiosie ,phytochimie , plantes médicinales. Ed. Tec & Doc. ; p: 461-769. 1999

CUPERUS. W. S. LE RITUEL AGRAIRE par H. GENEVOIS suivi d'une étude sur LA DEBÎHA, rite sacrificiel de fraternisation par, Le Fichier Périodique N° 127 (III) 1975, P 22-27.

CILLARD.le pole de compétitivité agroalimentaire en Bretagne Les antioxydants sont-ils nos alliés santé ? Interview du Professeur Josiane . lettre nutrition santé juin 2007 /N°6

CARSON et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*(tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology* 88: pp. 170-175. 2002.

DREW.D.P, SOREN.K.R, PINAROSA.B AVATOC and SIMONSENA.H.T .A
Comparison of Headspace Solid- phase Microextraction and Classic Hydrodistillation for the Identification of Volatile Constituents from *Thapsia* spp. Provides Insights into Guaianolide Biosynthesis in Apiaceae.2011

DURAFFOURD C. & LAPRAZ J. C. Traité de phytothérapie clinique, médecine et endobiogenie. Edition masson : (7, 139) p. 2002

DORMAN et DEANS, Dorman H.J.D. and Deans S.G.. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88, pp. 308-316. 2000

EL HAIB.A.Valorisation de terpenes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques, Doctorat de l'université de Toulouse,2011.

ELMEZOGLI.J, ZETRINIA.A, BEN-HUSSEIN.G, ANWAIR.M, ABDUL GBAJ, EL-ASHHEB.M, NAHAR.L and S.D. SARKER. Evaluation of anti-inflammatory activity of some libyan medicinal plants in experimental animals Arch. Biol. Sci., Belgrade, 64 (3), 1059-1063, 2012

FILLIAT.P. Les plantes de la famille des apiacées dans les troubles digestifs, thèse, soutenue publiquement à la faculté de pharmacie de Grenoble. Année 2012

Dr. GHEDDA El Habib, Directeur de la revue, revue des sciences fondamentales et appliquées, publication de l'institut des sciences et de technologie, centre universitaire d'El Oued, volume 3 issue 2, juillet-décembre 2011, P30 31

GOMEZ.F. L. M.; Síntesis de análogos de las taspigarginas. Mémoire en vue d'obtention du grade de doctorat en chimie. Département de chimie organique. Faculté des sciences. Université de Cádiz. puerto real. Espagne. 2007

HAMMOUDI.R, HADJ MAHAMMED.M, RAMDANE.F et KHODIR.A
activiteantibacterienne des extraits phenoliques de la plante *teucriumpoliumgeyri*
Algerian journal of aridenvironment vol. 2, n°1, Juin 2012:49-55

HOSEA.M, NELSON and BRIAN. M . Stoltz organic Letters vol num 0 A-D Progress toward the Synthesis of the Basiliolides and Transtaganolides: An Intramolecular Pyrone Diels-Alder Entry into a Novel Class of Natural Products. Received October 12, 2007

HAMEURLAINE.S, GHERRAF.N, LABED.B . reinvestigation of essential oil content of *Thapsia garganica* grown in the AURE, Le 2ème Séminaire International sur les Plantes Médicinales SIPM'2, Ouargla, du 19 au 20 Avril 2011 P12

IQBAL A., FARRUKH A. & MOHAMMAD O., 2006. Modern phytomedecine, turning Medicinal Plants into drugs. Edition: WILEY VCH: 360 p.

JAVAD SAFAEI-GHOMI, MOHAMMAD GHADAMIB, HOSSEIN .Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures Vol. 5, No 4, October-December 2010, p. 859-863
BIOACTIVITY OF METHANOL EXTRACTS OF EUCALYPTUS SARGENTII MAIDEN CULTIVATED IN IRAN

S.JUDD. W.S, CAMPBELL.C.S. Botanique systématique une perspective phylogénétique .
1^{re} édition. 2002 Paris P387

LADJEL.S, ZELLAGUIA and GHERRAF.N . reinvestigation of essential oil content of
thapsia Garganica grown in the east of Algeria *laboratory of biomolecules and plant
breeding, university of larbi ben m'hidi oum El bouaghi, Algeria 2011, Rev. sci. fond. app.,
vol. 3 N° 2 (2011), 30-34.

Lahlou M., Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils.
Phytotherapy Research 18 : pp. 435-448. 2004

LAGUERRE.M, LÓPEZ-GIRALDO. Outils d'évaluation *in vitro* de la capacité
antioxydante, *ocl*vol. 14 n° 5 septembre-octobre 2007, P283

LAMBERT.M, WOLENDER.J.L, Identification of Natural Products Using HPLC-SPE.
Combined with CapNMR. *Anal. Chem.* **2007**, 79, 727-735

LIU.H, OLSEN.C.E and S. BROGGER CHRISTENSEN . Tethered Lipids from *Thapsia*
garganica; *Journal of Natural Products* Volume 67, Number 9 September 2004

LIU.H, GUNNERTOFT.K.J , TRAN.L.M et al. . Cytotoxic phenylpropanoids and an
additional thapsigargin analogue isolated from *Thapsia garganica*, *Phytochemistry* 67 (2006)

MACÉ.F .Thèse Pour obtenir le grade de docteur de l'université de grenoble Spécialité :
Chimie organique Arrêté ministériel : 7 août 2006 Présentée par Thèse dirigée par le Pr Jean-
Pierre Deprés préparée au sein du Département de Chimie Moléculaire dans l'école Doctorale
Chimie et Sciences du Vivant Approche efficace des thapsigargines (guaïanolides) et
synthèse d'azulènes rouges *via* un intermédiaire commun de type bicyclo[5.3.0]décane

MACHEIX. J-J. FLEURIET.A, C. J-ALLEMAND. les composés phénoliques des
végétaux un exemple de métabolites secondaires d'importance économique 2005 .presse
polytechnique et universitaires romandes Lausanne

MEHINAGIC.E, BOURLES.E et JOURJON.F. Composés des fruits d'intérêt
nutritionnel: impact des procédés de transformation sur les polyphénols, Ecole supérieure

d'agriculture d'Angers Revue suisse Viticulture, Arboriculture, Horticulture | Vol. 43 (6): 364–368, 2011

MILPIED.H. Progrès en dermato-allergologie, Bardeaux 2009. Edition John Libbey
EUROTEXT : 128p. 2009

MOLYNEUX.P. S . The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity J. Sci. Technol. Vol. 26 No. 2 Mar.-Apr. 2004

NÉGRE.R. Petite flore des régions arides du maroc occidentale, Tome 2, 1962 P114 115

NOUH. A, AKKACHE. R. Extraction et caractérisation phytochimique et biologique de l'huile essentielle d'une plante spontanée «*Thapsia garganica* L.» de la région kherrata -bejaia- 2012.

PARIS. R.R, MOYSE.H. précis de matière médicale : pharmacognosie spéciale spermatophytes (Apiales et Dialypétales), Tome 2, Paris 1981, P487.

PEYROU et al. antibioresistance des souches bactériennes d'origine équine : étude bibliographique et exemple de l'hôpital vétérinaire de St-Hyacinthe Peyrou Mathieu, Toulouse, 2001.

Pharmacopée française 2012

POPVICI.C, SAYKOVA.I, TYLKOWSKI.B. Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH ; Revue de génie industriel **2009**, 4, 25-39

QUEZEL.P professeur à la faculté des sciences d'Alger et **S.SANTA** docteur en pharmacie avec la collaboration technique de Mme O. SCHOTTER préface du Pr I. EMBERGER correspondant de l'Institut tome 1. 1962. P 656 . Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales
REICHEL et al ., 2004

ROUX, RONALD. L. PRIOR, XIANLI .WU, AND KAREN. Conseil en aromathérapie. 2ème Edition : Pro- Officina : (31, 14, 15) pp. 2008. **SCHAICH** . Standardized Methods for

the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements,
J. Agric. Food Chem. **2005**, 53, 4290-4302

SABALA.P et al.; Thapsigargin: potent inhibitor of Ca²⁺ transport ATP-ases of
endoplasmic and sarcoplasmic reticulum ; *ActaBiochimicapolonica* ; Vol 40. J ; 1993

L'organisation des nations unies pour l'éducation (UNESCO) les plantes midicinles des
régions arides Parie 7^{eme} édition 1960. P82

Viala A.2007. Definition, domaine de la toxicologie, notions sur la toxicite dans Viala A.,
Botta A. Toxicologie, editions Tec et Doc et editions Medicales Internationales. Pp: 06. 2007

Young B, Lowe J S.. Atlas d'histologie fonctionnelle de Wheater.2eme edition. DeBoeck.
Pp: 288, 294, 402. 2008

Annexes

Annexes1 :



Fleurs de *Thapsia garganica* L (original).



Feuilles de *Thapsia garganica* L (original).



Racine de *Thapsia garganica* L sec (originale).

Annexes2 :



Hydrodistillation montage Clevenger.

Annexes 3 :



Rotavapeur.

Annexes 4 :



Tubes à essais avec la solution DPPH.

Tableau des HE des 3 concentrations (méthode β -carotène)

| | | C 1 | | | | | | |
|---------|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 24 | 48 |
| 17-févr | F C1 | 0,3919 | 0,3631 | 0,3523 | 0,3475 | 0,3368 | 0,1847 | 0,1414 |
| 17-févr | R C1 | 0,3863 | 0,3596 | 0,3423 | 0,3325 | 0,3243 | 0,1613 | 0,1108 |
| 17-mars | F C1 | 0,3976 | 0,3653 | 0,3552 | 0,3522 | 0,3437 | 0,2047 | 0,1773 |
| 17-mars | R C1 | 0,3911 | 0,3641 | 0,3455 | 0,3398 | 0,3305 | 0,186 | 0,1354 |
| 21-mars | F C1 | 0,3896 | 0,3577 | 0,3365 | 0,3325 | 0,3261 | 0,1631 | 0,1317 |
| 21-mars | R C1 | 0,4012 | 0,3658 | 0,3513 | 0,3468 | 0,3429 | 0,2009 | 0,1462 |
| 25-mars | F C1 | 0,3854 | 0,3557 | 0,3292 | 0,3234 | 0,3162 | 0,1615 | 0,1244 |
| 25-mars | R C1 | 0,4168 | 0,3886 | 0,3739 | 0,3703 | 0,3613 | 0,2413 | 0,1932 |
| BHT | C 1 | 0,3997 | 0,384 | 0,3797 | 0,3717 | 0,3689 | 0,327 | 0,2938 |
| contrle | C | 0,3857 | 0,3598 | 0,3082 | 0,2596 | 0,2362 | 0,1003 | 0,068 |

| | | C 2 | | | | | | |
|---------|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 24 | 48 |
| 17-févr | F C2 | 0,3956 | 0,3681 | 0,3638 | 0,3596 | 0,3477 | 0,2181 | 0,1631 |
| | R C2 | 0,3926 | 0,3636 | 0,3495 | 0,3456 | 0,3381 | 0,1903 | 0,1519 |
| 17-mars | F C2 | 0,4043 | 0,3761 | 0,3687 | 0,3606 | 0,3552 | 0,237 | 0,1921 |
| | R C2 | 0,4022 | 0,3698 | 0,357 | 0,3508 | 0,3443 | 0,2007 | 0,1538 |
| 21-mars | F C2 | 0,3928 | 0,3634 | 0,3423 | 0,3398 | 0,3314 | 0,2058 | 0,1322 |
| | R C2 | 0,4064 | 0,3729 | 0,3599 | 0,3528 | 0,3495 | 0,212 | 0,1588 |
| 25-mars | F C2 | 0,3881 | 0,3615 | 0,334 | 0,3304 | 0,3276 | 0,2011 | 0,1425 |
| | R C2 | 0,4098 | 0,3738 | 0,3629 | 0,3581 | 0,3535 | 0,2485 | 0,2021 |
| BHT | C 2 | 0,4035 | 0,3936 | 0,3879 | 0,3798 | 0,37 | 0,3305 | 0,3286 |
| contrle | C | 0,3857 | 0,3598 | 0,3082 | 0,2596 | 0,2362 | 0,1003 | 0,068 |

| | | C 2 | | | | | | |
|---------|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 24 | 48 |
| 17-févr | F C2 | 0,4099 | 0,3763 | 0,3758 | 0,3687 | 0,3564 | 0,2627 | 0,2175 |
| | R C2 | 0,3974 | 0,3722 | 0,358 | 0,3555 | 0,3491 | 0,2513 | 0,2019 |
| 17-mars | F C2 | 0,4133 | 0,3895 | 0,38 | 0,3745 | 0,3611 | 0,2829 | 0,2518 |
| | R C2 | 0,4103 | 0,3741 | 0,3651 | 0,3607 | 0,3526 | 0,2513 | 0,2091 |
| 21-mars | F C2 | 0,395 | 0,3679 | 0,3503 | 0,3484 | 0,3382 | 0,2378 | 0,1932 |
| | R C2 | 0,413 | 0,378 | 0,3712 | 0,3683 | 0,3575 | 0,2591 | 0,2158 |
| 25-mars | F C2 | 0,3919 | 0,3663 | 0,3481 | 0,3442 | 0,3359 | 0,2338 | 0,1984 |
| | R C2 | 0,4168 | 0,3786 | 0,3739 | 0,3703 | 0,3613 | 0,303 | 0,2633 |
| BHT | C 3 | 0,4038 | 0,3974 | 0,3914 | 0,3858 | 0,3804 | 0,3381 | 0,3307 |
| contrle | C | 0,3857 | 0,3598 | 0,3082 | 0,2596 | 0,2362 | 0,1003 | 0,068 |

Tableau des EXT des 3 concentrations (méthode β -carotène)

| | | C 1 | | | | | | |
|----------|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 24 | 48 |
| 17-févr | F C1 | 0,15 | 0,1315 | 0,1223 | 0,1197 | 0,1181 | 0,084 | 0,0563 |
| 17-févr | R C1 | 0,1496 | 0,1277 | 0,1149 | 0,1143 | 0,1096 | 0,0719 | 0,0452 |
| 17-mars | F C1 | 0,1504 | 0,1369 | 0,1252 | 0,1226 | 0,12 | 0,0881 | 0,0592 |
| 17-mars | R C1 | 0,1499 | 0,1295 | 0,1186 | 0,1164 | 0,113 | 0,0741 | 0,0487 |
| 21-mars | F C1 | 0,1509 | 0,14 | 0,1313 | 0,1286 | 0,1244 | 0,0926 | 0,0655 |
| 21-mars | R C1 | 0,1503 | 0,1352 | 0,1227 | 0,1203 | 0,1174 | 0,0813 | 0,0523 |
| 25-mars | F C1 | 0,1503 | 0,1382 | 0,1279 | 0,1255 | 0,122 | 0,0905 | 0,0619 |
| 25-mars | R C1 | 0,1501 | 0,132 | 0,1201 | 0,1186 | 0,1142 | 0,0789 | 0,0501 |
| contrôle | C | 0,1591 | 0,1243 | 0,1105 | 0,1057 | 0,0943 | 0,0482 | 0,012 |

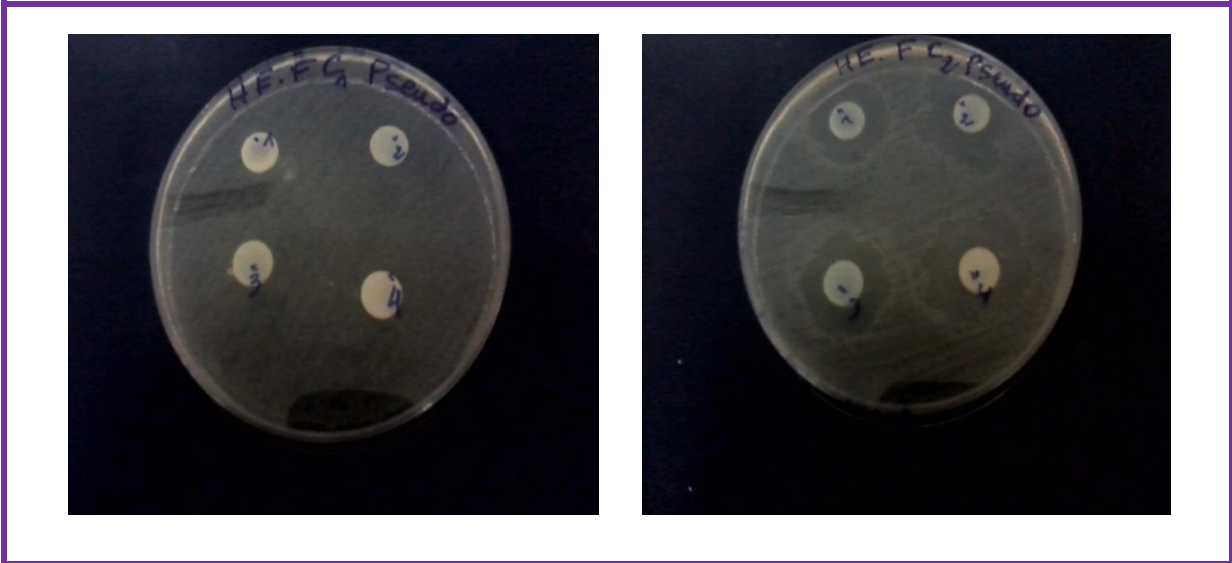
| | | C 2 | | | | | | |
|----------|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 24 | 48 |
| 17-févr | F c1 | 0,1504 | 0,1353 | 0,1251 | 0,1238 | 0,12 | 0,0874 | 0,0594 |
| 17-févr | R C2 | 0,15 | 0,13 | 0,1184 | 0,1143 | 0,1113 | 0,0758 | 0,0483 |
| 17-mars | F C2 | 0,1512 | 0,1397 | 0,1285 | 0,1264 | 0,1221 | 0,0911 | 0,0628 |
| 17-mars | R C2 | 0,1505 | 0,134 | 0,1201 | 0,1192 | 0,1142 | 0,0784 | 0,0502 |
| 21-mars | F C2 | 0,1516 | 0,146 | 0,1351 | 0,1308 | 0,1273 | 0,0954 | 0,0681 |
| 21-mars | R C2 | 0,1507 | 0,1398 | 0,1275 | 0,1241 | 0,1193 | 0,0845 | 0,056 |
| 25-mars | F C2 | 0,1513 | 0,1437 | 0,1306 | 0,1287 | 0,1259 | 0,0934 | 0,0654 |
| 25-mars | R C2 | 0,1506 | 0,1372 | 0,1248 | 0,1209 | 0,117 | 0,0803 | 0,0534 |
| contrôle | C | 0,1591 | 0,1243 | 0,1105 | 0,1057 | 0,0943 | 0,0482 | 0,012 |

| | | C 3 | | | | | | |
|----------|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 24 | 48 |
| 17-févr | F C3 | 0,1511 | 0,139 | 0,1286 | 0,126 | 0,1232 | 0,0901 | 0,0621 |
| 17-févr | R C3 | 0,1504 | 0,1346 | 0,1206 | 0,1191 | 0,1138 | 0,0781 | 0,0505 |
| 17-mars | F C3 | 0,1514 | 0,1429 | 0,1313 | 0,1282 | 0,1252 | 0,0932 | 0,0657 |
| 17-mars | R C3 | 0,1507 | 0,1382 | 0,1238 | 0,121 | 0,1169 | 0,0806 | 0,0521 |
| 21-mars | F C3 | 0,1518 | 0,1481 | 0,1405 | 0,1335 | 0,1298 | 0,0981 | 0,0711 |
| 21-mars | R C3 | 0,1509 | 0,1428 | 0,1313 | 0,1279 | 0,1228 | 0,0889 | 0,0589 |
| 25-mars | F C3 | 0,1515 | 0,1443 | 0,1355 | 0,1305 | 0,128 | 0,0956 | 0,0692 |
| 25-mars | R C3 | 0,1508 | 0,1408 | 0,1284 | 0,124 | 0,1199 | 0,0851 | 0,055 |
| contrôle | C | 0,1591 | 0,1243 | 0,1105 | 0,1057 | 0,0943 | 0,0482 | 0,012 |

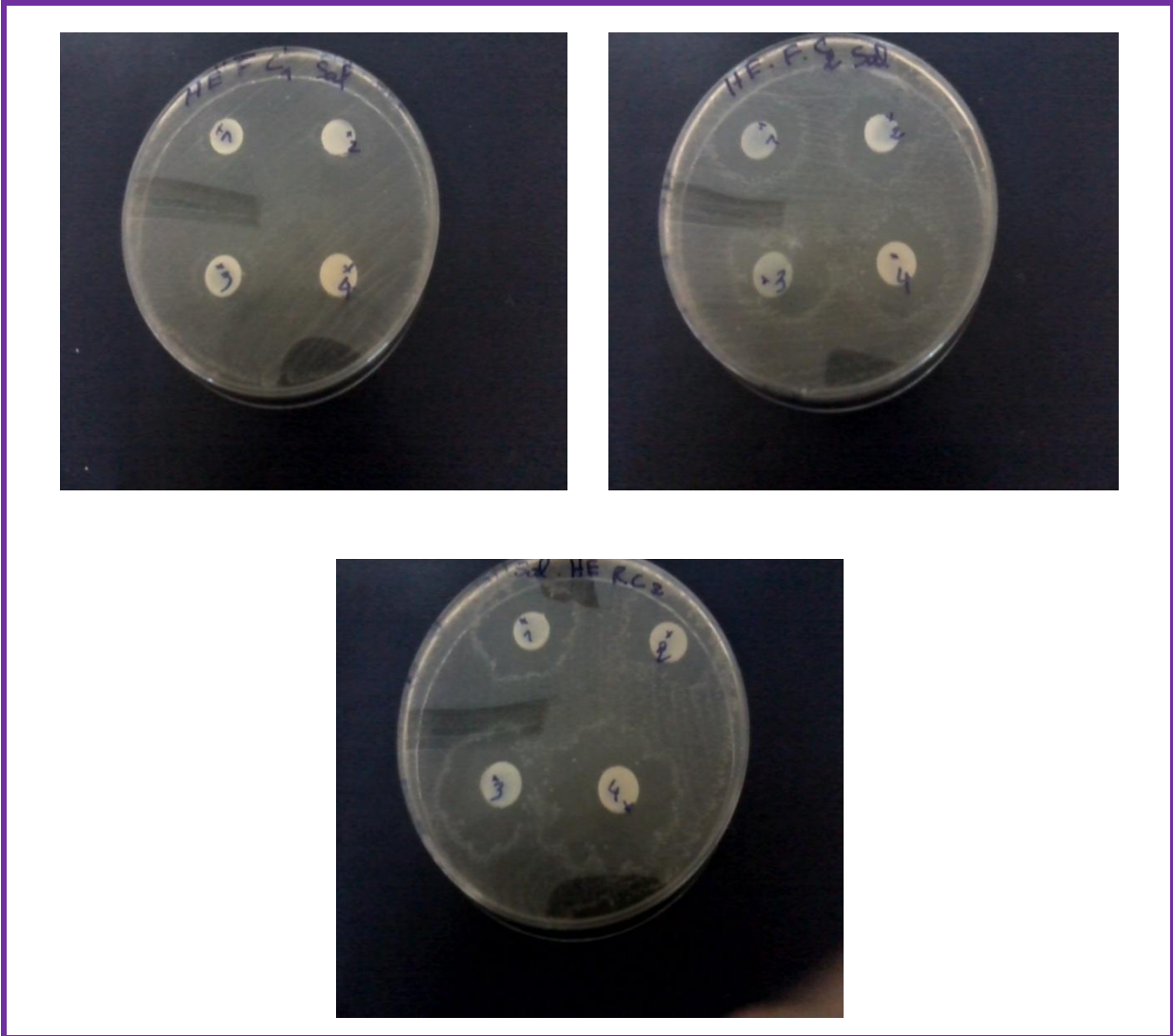
Annexes 5 :

| Diamètres des zones d'inhibition (cm). | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|---------|-------|-------|-----|--------|-----|----------|-----|----------|-----|---------|-----|----------|-----|----|----|
| Germes | E-coli | | Salmo | | pseudo | | Cand.alb | | Cand.tra | | aspergi | | pénicelu | | | |
| concentratio | C1 | C2 | C1 | C2 | C1 | C2 | C1 | C2 | C1 | C2 | C1 | C2 | C1 | C2 | | |
| FEUILLES | 17/02 | ++ | +++ | ++ | +++ | -- | +++ | ++ | +++ | -- | +++ | -- | ++ | -- | -- | |
| | | ++ | +++ | ++ | +++ | -- | +++ | +++ | +++ | -- | +++ | -- | ++ | -- | -- | |
| | 17/03 | ++ | +++ | ++ | +++ | ++ | +++ | ++ | +++ | -- | +++ | -- | ++ | -- | -- | |
| | | ++ | +++ | ++ | +++ | -- | +++ | +++ | +++ | -- | +++ | -- | ++ | -- | -- | |
| | 21/03 | +++ | +++ | ++ | +++ | -- | +++ | +++ | +++ | -- | +++ | -- | ++ | -- | -- | |
| | | +++ | +++ | ++ | +++ | -- | +++ | +++ | +++ | -- | +++ | -- | ++ | -- | -- | |
| | 25/03 | ++ | +++ | -- | +++ | ++ | +++ | +++ | +++ | -- | +++ | -- | +++ | -- | -- | |
| | | ++ | +++ | -- | +++ | ++ | +++ | +++ | +++ | -- | +++ | -- | +++ | -- | -- | |
| | RACINES | 17/02 | -- | +++ | -- | +++ | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | -- | +++ | -- | -- |
| | | | -- | +++ | -- | +++ | ++ | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ | -- | +++ | -- | -- |
| | | 17/03 | -- | +++ | -- | +++ | ++ | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ | -- | +++ | -- | -- |
| | | | -- | +++ | -- | +++ | ++ | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ | -- | +++ | -- | -- |
| 21/03 | | -- | +++ | -- | +++ | ++ | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ | -- | +++ | -- | -- | |
| | | -- | +++ | ++ | +++ | ++ | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ | -- | +++ | -- | -- | |
| 25/03 | | -- | +++ | -- | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | -- | +++ | -- | -- | |
| | | ++ | +++ | -- | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ | -- | +++ | -- | -- | |

la sensibilité des germes vis-à-vis l'huile essentielle de *Thapsia garganica L.*



Photos montrant l'effet des huiles essentielles des feuilles de thapsia garganica L des 04 récolte, des sur pseudomonas.



Photos montrant l'effet des huiles essentielles de thapsia garganica L des 04 récolte, des sur salmonella.

Annexes 6 :



Cage pour souris.



Une souris.



Gavage des souris.



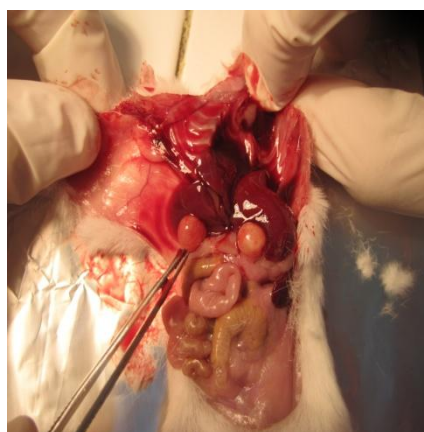
Anesthésie



décapitation



récupération des organes



Foie atteint.



Cassettes d'inclusion.



Technicon.



Automate de paraffinage.



Microtome.