



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID - TLEMCCEN

THÈSE

Présentée à :

FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE CHIMIE

Pour l'obtention du diplôme de :

DOCTORAT EN SCIENCES

Spécialité: Chimie Organique

Par :

Mme AICI Djahida

Sur le thème

**Contribution à l'étude phytochimique et biologique de deux
plantes médicinales *Thapsia garganica* L. et *Prunus persica* L.**

Soutenue publiquement le 22 / 06 / 2022 à Tlemcen devant le jury composé de :

Mr ALLALI Hocine	Professeur	Université de Tlemcen	Président
Mr BENMEHDI Houcine	Professeur	Université de Béchar	Directeur de thèse
Mr AMROUCHE Abdelillah	Professeur	Centre Universitaire de Naama	Examineur
Mr SELES Chaouki	Professeur	Université de Tlemcen	Examineur
Mr AMMAM Abdelkader	Maître de Conférences A	Université de Saida	Examineur

Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO)

BP 119, 13000 Tlemcen - Algérie

Dédicaces

C'est avec l'aide et la grâce du Dieu que j'ai achevé ce modeste travail que je dédie :

A mes très chers parents,

MAMAN

Tes prières et tes bénédictions m'ont accompagnée tous les jours de mes études ; combien long, long a été ce chemin dont j'atteins le but aujourd'hui et ceci grâce à tes encouragements, ta patience, ta sollicitude de tous les instants qui ont été pour moi le précieux des soutiens. Ton Amour inconditionnel et ta compréhension me resteront toujours un exemple à suivre. Que ce travail fasse ta fierté et reflète ton image.

PAPA

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

C'est avec les yeux débordants de larmes d'amour que je rédige ces mots.

Je ne trouverai jamais l'expression forte pour vous exprimer mon amour, ma reconnaissance et ma profonde gratitude pour tous les sacrifices consentis et pour la chance que j'ai eu d'être née entre d'aussi merveilleuses personnes. Vous avez de tout temps fait de moi un enfant comblé.

Seigneur, combles-les de ta Miséricorde et prête leur longue vie.

Papa, maman je Vous aime.

A mes petits-enfants HAYTHEM et CHAHINE, lumière de ma vie.

A mon adorable sœur FATIMA ZOHRA, mon bras droit.

A mon mari ABDESSELAM, Je n'ai pas de mots pour te dire à quel point je te remercie. Mais, tu le sais, le plus beau est à venir pour nous... Il nous reste 99 ans ; INCHA ALLAH ; non la vie entière pour en profiter.

A mes chers frères HICHEM et ABDELHAFID

Je vous aime tous.

DJAHIDA

Remerciements

Ce travail est le fruit de collaborations forgées sur la sincère volonté d'offrir une contribution, quelle qu'elle soit, à la recherche.

Mes remerciements les plus profonds et inexprimables, s'adressent avant tout à ALLAH le tout puissant, de m'avoir accordé la force, la santé et le courage afin de pouvoir accomplir ce modeste travail.

Mes très profondes reconnaissances et mes sentiments les plus sincères vont à mon Directeur de thèse, Pr BENMEHDI Houcine, Professeur au Département des Sciences Biologiques de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'Université TAHRI Mohamed- Béchar, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'encadrer ce travail, de le diriger avec tant de compétence et de gentillesse. Ses conseils et ses orientations éclairées m'ont permis de mener à terme ce travail.

Ma vive reconnaissance va au Pr ALLALI Hocine, Professeur à l'Université Abo Bekr Belkaid- Tlemcen d'avoir accepté de présider le jury de soutenance. Qu'il soit assuré de ma respectueuse considération.

J'adresse mes remerciements à Pr SELLES Chaouki, Professeur à l'Université Abo Bekr Belkaid- Tlemcen, d'avoir accepté de juger ce travail. Je présente ici le témoignage de ma sincère gratitude.

Je suis profondément reconnaissante au Professeur AMROUCHE Abdelillah, Professeur au Centre Universitaire Salhi Ahmed – Naama pour avoir bien voulu examiner et juger mon travail. Vous avez tout mon respect.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent également à Mr AMMAM Abdelkader, Maître de conférences à l'Université Moulay Tahar- Saida pour l'honneur qu'il me fait en acceptant d'examiner et jurer cette thèse. Qu'il trouve ici mes sincères expressions de gratitude et de respect.

J'adresse également mes sincères remerciements à Monsieur RAHMANI Youcef de Centre de Recherche et Analyses Physico-chimique Ouargla (CRAPC) pour son aide concernant la réalisation des analyses CG/SM des huiles essentielles.

Remerciements

Je suis profondément reconnaissante au Pr SAIDI BESBES Salima ; la directrice de Laboratoire de Synthèse Organique Appliqué, Université AHMED Ben Bella Oran ; ainsi que Mme HIDOUR Hanaa ; ingénieur de laboratoire, pour l'aide qu'elles m'ont apportées afin de réaliser les analyses RMN. J'adresse également mes vifs remerciements à Pr ADJRIR Mehdi qui a veillé sur le bon déroulement de ces analyses.

Je voudrais remercier, aussi, l'ensemble du personnelles de laboratoires pédagogiques de chimie à l'université TAHRI Mohamed de Béchar : DJELLOUL Othman, BOULERBAG Larbi, pour leur aide au sein des laboratoires et surtout pour la fourniture du matériel et des produits nécessaires pour la réalisation des manipulations.

Toutes les expressions de reconnaissance pour mes parents qui voulaient tout le temps que je pousse mes études jusqu'au bout avec un soutien incontestable, Merci pour tout, je vous admire...

Finalement, un merci du fond du cœur à mon mari Pr BASSOU Abdesselam qui est toujours à mes côtés, qui m'a aidé, m'a encouragé, m'a soutenu et surtout m'a supporté pendant les moments difficiles. Pour m'avoir aidé à l'écriture de cette thèse. Merci pour ton soutien et surtout ta patience.

تحتوي المستخلصات الطبيعية من النباتات على مجموعة متنوعة من الجزيئات النشطة بيولوجيًا. في هذا السياق، وفي إطار تقييم اثنين من النباتات الطبية *Prunus persica* L. (أوراق) و *Thapsia garganica* L. (الأوراق والجذور)، ركز عملنا على الدراسة الكيميائية النباتية والبيولوجية للمستخلصات المختلفة من هذين النباتين. أعطى الاستخلاص الانتقائي للفلافونيدات (مستخلص: البيوتانول، أسيتات الإيثيل والأثير)، العفص، الصابونوزيدات والقلويدات مردودات مقبولة تتراوح من 0.33% إلى 3.62% لكلا النباتين. كما كان أفضل مردود 18.10% للزيوت الأساسية لأوراق *T. garganica*. من ناحية أخرى، كانت محتويات البوليفينول للمستخلص الميثانولي والمائي لأوراق *P. persica* على التوالي (2.5: 1.14 مجم EAG/100 مل Ms). بينما تحديد مادة البوليفينول في المستخلصات الميثانولية من أوراق وجذور نبات *T. garganica* أعطى محتويات (2.21: 1.63 مجم EAG/100 مل Ms) على التوالي. أتاح تحليل الكروماتوغرافيا الغازية / طيف الكتلة للزيوت الأساسية لأوراق TG إمكانية تمييز مجموعات كبيرة من المركبات مثل: (+) - 3-كارين ، 10- (أسيتيل ميثيل) (25.69%) ، كحول فورفوريل (10.96%) ، فورفورال (7.69%) ، إيثانول ، 1- (1(1H-pyrrol-2-yl) (6.49%) ، حمض هيبثانويك (6.17%) ، يوجينول (4.24%) ، بوتيروفانيولون (2.57%). كما سمح لنا الفصل بواسطة كروماتوغرافيا العمود بالحصول على 06 مركبات من عائلة الفلافونويد والتي تم تحديدها لاحقًا بواسطة الرنين المغناطيسي النووي للبروتون والكربون. أظهر تقييم قوة إرجاع الجذور الحرة DPPH أن المستخلصات المختلفة التي تم اختبارها لها إمكانات ملحوظة كمضادات للأكسدة. وقد لوحظت قدرة مضادات الأكسدة القوية لـ FRAP في جميع المستخلصات مقارنةً بحمض الأسكوربيك. تمت دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا للمستخلصات المختلفة على سبع سلالات بكتيرية. تُظهر هذه التقنية تثبيطًا كبيرًا للمستخلصات ضد *Pseudomonas aeruginosa* و *Klebsiella pneumoniae* و *Bacillus cereus* و *Staphylococcus aureus*. كانت أعلى منطقة تثبيط هي تلك الخاصة بمستخلصي الفلافونويد والصابونوزيد لأوراق *T. garganica* بقطر 20 ملم. توضح طريقة النمو العرضي في الوسط الصلب ضد سلالتين فطريتين تثبيطًا كبيرًا للمستخلص الميثانولي لجذور TG ضد *Aspargillus flavus* ، مما يحد من نمو هذه الفطريات على قطر 46 مم. دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا في الجسم الحي لمستخلصات أوراق نبات *T. garganica* ضد سلالة *Pseudomonas aeruginosa* على مجموعة من الأرناب المحلية. تشير النتائج إلى أن مستخلص ثنائي إيثيل الأثير من مركبات الفلافونويد يثبط السلالة المستهدفة لمدة تصل إلى سبعة أيام، مع انخفاض ملحوظ في أحجام الجرح ودرجات الحرارة. الكلمات المفتاحية: *Thapsia garganica* L. ، *Prunus persica* L. ، المركبات الفينولية ، النشاط المضاد للأكسدة ، النشاط المضاد للجراثيم ، الكروماتوغرافيا الغازية/ مطياف الكتلة ، الرنين المغناطيسي النووي.

Résumé

Les extraits naturels issus des végétaux contiennent une variété de molécules biologiquement actives. C'est dans ce contexte, et dans le cadre de la valorisation de deux plantes médicinales *Prunus persica* L. (Feuilles) et *Thapsia garganica* L. (feuilles et racines), notre travail a été porté sur l'étude phytochimique et biologique des différents extraits de ces deux plantes.

L'extraction sélective des flavonoïdes (fractions : butanolique, acétate d'éthyle et étheré), des tannins, des saponosides et des alcaloïdes a donné des rendements acceptables varie entre 0.33% et 3.62% pour les deux plantes. Par contre, le meilleur rendement obtenu est de 18.10% pour les huiles essentielles des feuilles de *T. garganica*. D'autre part, les teneurs des polyphénols des extraits méthanolique et aqueux des feuilles de *P. persica* ont été respectivement de (2,5 ; 1,14 mg EAG/100 mg Ms). Tandis que le dosage des polyphénols des extraits méthanoliques des feuilles et des racines de *T. garganica* a donné les teneurs de (2,21 ; 1,63 mg EAG/100 mg Ms), respectivement.

L'identification par CG/SM des huiles essentielles des feuilles de TG a permis d'identifier plusieurs composés à savoir : (+)-3-Carene, 10-(acétylméthyl) (25,69 %), l'alcool furfurylique (10,96 %), le furfural (7,69%), Ethanone, 1-(1H-pyrrol-2-yl) (6,49%), L'acide heptanoïque (6,17%), l'Eugénol (4,24%) et Butyrovanillone (2,57%).

La séparation par chromatographie sur colonne nous a permis d'obtenir 06 composés de la famille des flavonoïdes qui sont par la suite identifiés par RMN ¹H et RMN ¹³C.

L'évaluation de pouvoir de piégeage de radical libre DPPH• montre que les différents extraits testés ont un potentiel antioxydant remarquable. Une forte capacité antioxydante du FRAP a été notée dans tous les extraits en comparaison avec celle de l'acide ascorbique.

L'activité antibactérienne des différents extraits a été étudiée sur sept souches bactériennes. Cette technique affiche une inhibition importante des extraits contre les *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*. Ce qui concerne l'activité antifongique, la méthode de la croissance radiale dans le milieu solide contre deux souches fongiques, illustre une inhibition importante de l'extrait méthanolique des racines de TG contre l'*Aspergillus flavus* dont il limite la croissance de ce champignon sur un diamètre de 46 mm.

L'activité antibactérienne in vivo des extraits des feuilles de *T. garganica* a été étudiée contre la souche *Pseudomonas aeruginosa* sur des lapins de race locale. Les résultats indiquent que la fraction étherique des flavonoïdes inhibe la souche ciblée pour une durée de sept jours, avec une diminution remarquable des tailles des plaies et des degrés de température.

Mots clés : *Prunus persica* L., *Thapsia garganica* L., composés phénoliques, activité antioxydante, pouvoir antimicrobien, CG/SM, RMN.

Plants natural extracts contain a variety of biologically active molecules. In this regard, as a part of the valuation of two medicinal plants *Prunus persica* L. (leaves) and *Thapsia garganica* L. (leaves and roots), the focus of the present study is set on investigating the phytochemical composition and biological activity of different extracts from these two plants.

On the one hand, selective extraction of flavonoids (butanol fraction, ethyl acetate and ether), tannins, saponosides and alkaloids gave acceptable yields varying between 0.33% and 3.62% for both plants. However, the best yield was obtained in the essential oils of *T. garganica* leaves (18.10%). On the other hand, total phenolic contents of methanol and aqueous extracts of *P. persica* leaves were respectively (2.5; 1.14 mg EAG / 100 mg DM) while those of methanolic extracts of *T. garganica* leaves and roots were respectively 2.21 and 1.63 mg EAG / 100 mg DM.

The GC/MS analysis of essential oils from *T.garganica* leaves revealed several compounds such as: (+) - 3-Carene, 10- (acetylmethyl) (25.69%), furfuryl alcohol (10.96%), Furfural (7.69%), Ethanone, 1- (1H-pyrrol-2-yl) (6.49%), Heptanoic acid (6.17%), Eugenol (4.24%) and Butyrovaniellone (2.57%).

Separation by column chromatography allowed us to obtain 06 compounds belonging to flavonoids' family, which were subsequently identified by NMR ¹H and NMR ¹³C.

The evaluation of the DPPH• free radical scavenging power showed remarkable antioxidant potential of all tested extracts. In Frap assay, a strong antioxidant capacity was noted in all extracts compared to that of ascorbic acid.

The antibacterial activity of the different extracts was evaluated against seven bacterial strains. All extracts exhibited significant inhibition against *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. Regarding the antifungal activity, the method of radial growth on solid medium against two fungal strains, methanolic extract of the roots of *T.garganica* showed a significant inhibition against *Aspargillus flavus* by limiting fungal growth over a diameter of 46 mm.

The in vivo antibacterial activity of *T. garganica* leaves extracts was assessed against *Pseudomonas aeruginosa* on local rabbits. The obtained results indicated that diethyl ether extract inhibited the strain's growth for a period of seven days, with a remarkable decrease in wound sizes and temperature degrees.

Key words: *Prunus persica* L., *Thapsia garganica* L., phenolic compounds, antioxidant activity, antimicrobial power, GC / MS, NMR.

Abréviations

AFNOR :	Association française de Normalisation.
ATCC :	American Type Culture Collection.
BID :	dielectric Barrier discharge ionization Detector.
CCM :	Chromatographie sur Couche Mince.
CI₅₀ :	Concentration Inhibitrice Médiane.
CPG / SM :	Chromatographie en phase gazeuse / Spectroscopie de masse.
DMSO :	Diméthyle sulfoxyde.
E.A :	Extrait Alcaloïdes.
E.F.AE :	Extrait Flavonoïdes Acétate d'Ethyle.
E.F.B :	Extrait Flavonoïdes Butanol.
E.F.EE :	Extrait Flavonoïdes Ether di-Ethérique.
E.M.F :	Extrait Méthanolique Feuilles.
E.M.R :	Extrait Méthanolique Racines.
E.S.F :	Extrait Saponosides Feuilles.
E.S.R :	Extrait Saponosides Feuilles.
ET :	Equivalent Trolox.
E.T.F :	Extrait Tanins Feuilles.
E.T.R :	Extrait Tanins Feuilles.
EAG :	Equivalent acide gallique.
EAR :	Efficacité Anti Radicalaire.
EC :	Equivalent catéchine.
EOR :	Espèces oxygénées réactives.
FRAP:	Capacités réductrices ferriques d'antioxydants (Ferric Reducing Antioxidant Power).
FTD :	Flame Thermionic Detector.
HE :	Huile Essentielle.
LAPRONA :	Laboratoire des Produits Naturels.
PAR :	Puissance Anti Radicalaire.
PDA :	Potato Dextrose Agar.
PP :	<i>Prunus persica</i> L.
Ps:	Poids sec.
RMN:	Résonance Magnétique Nucléaire.
RSA :	Radical Scavenger Activity.
SERCA:	Sarco Endoplasmic Reticulum Calcium.

Abréviations

SERCA-ATPases :	Sarco Endoplasmic Reticulum Ca ²⁺ -ATPase.
SFM :	Société Française de Microbiologie.
TG:	<i>Thapsia garganica</i> L.
UABT:	Université Abo Bekr Belkeid Tlemcen.
UFC :	Unité Formatrice de Colonie.
UTMB :	Université Tahri Mohamed Bechar.
V.R.V.S.A :	Laboratoire de Valorisation des Ressources Végétales et Sécurité Sanitaire dans les zones Semi-Arides.

Liste des figures

N°	Titre	Page
Figure 01 :	Structure de base d'un flavonoïde.....	06
Figure 02 :	Exemple d'un tannin condensé.....	09
Figure 03 :	Exemple d'un tannin hydrolysable.....	09
Figure 04 :	Différentes formes de squelette d'un aglycone.....	11
Figure 05 :	Structure de bases des saponosides.....	11
Figure 06 :	Structures de quelque alcaloïdes.....	12
Figure 07 :	Forme libre et réduite du DPPH.....	14
Figure 08 :	Réaction de la méthode FRAP.....	15
Figure 09 :	Structure de Thapsigargin.....	18
Figure 10 :	Photographies de la partie aérienne et sous terrain de la plante <i>Thapsia garganica</i>	18
Figure 11 :	Photographie de la plante <i>Prunus persica</i>	25
Figure 12 :	Courbe d'étalonnage de solution DPPH.....	47
Figure 13 :	Spectre de RMN du proton du produit PPAE4.....	72
Figure 14 :	Spectre de RMN du carbone 13 du produit PPAE4.....	73
Figure 15 :	Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux.....	76
Figure 16 :	Teneur en polyphénols totaux des feuilles de <i>Prunus persica</i>	76
Figure 17 :	Teneur en polyphénols totaux de <i>Thapsia garganica</i>	76
Figure 18 :	Courbe d'étalonnage des flavonoïdes totaux.....	77
Figure 19 :	Teneur en flavonoïdes totaux des feuilles de <i>Prunus persica</i>	77
Figure 20 :	Teneur en flavonoïdes totaux <i>Thapsia garanica</i>	78
Figure 21 :	Courbe d'étalonnage des tanins condensés des extraits de <i>Prunus persica</i> ...	78
Figure 22 :	Teneur en tanins condensés des feuilles de <i>Prunus persica</i>	79
Figure 23 :	Teneur en tanins condensés de <i>Thapsia garganica</i>	79
Figure 24 :	Réduction de DPPH par l'acide ascorbique.....	80
Figure 25 :	CI50 des différents extraits de la plante <i>Thapsia garganica</i>	81
Figure 26 :	CI50 des différents extraits de la plante <i>Prunus persica</i>	81
Figure 27 :	Réduction de DPPH par les différents extraits de la plante PP.....	82
Figure 28 :	Réduction de DPPH par les différents extraits de la plante TG.....	82
Figure 29 :	Réduction de fer par les différents extraits de <i>Prunus persica</i>	85
Figure 30 :	Réduction de fer par les différents extraits de <i>Thapsia garganica</i>	85
Figure 31 :	Résultats de l'activité antibactérienne des extraits sélectifs de <i>Thapsia garganica</i> contre <i>P. aeruginosa</i>	87

Liste des figures

Figure 32 :	Réaction de l'activité antibactérienne des extraits sélectifs de <i>Thapsia garganica</i> contre <i>Bacillus cereus</i>	87
Figure 33 :	Réaction de l'activité antibactérienne des extraits sélectifs de <i>Thapsia garganica</i> contre <i>Enterococcus faecalis</i>	87
Figure 34 :	Réaction de l'activité antibactérienne des extraits sélectifs de <i>Thapsia garganica</i> contre <i>Staphylocoques aureus</i>	88
Figure 35 :	Réaction de l'activité antibactérienne des extraits sélectifs de <i>Thapsia garganica</i> contre <i>Salmonella typhi</i>	88
Figure 36 :	Réaction de l'activité antibactérienne des extraits sélectifs de <i>Thapsia garganica</i> contre <i>Klebsiella pneumoniae</i> et <i>Escherichia coli</i>	88
Figure 37 :	Résultats de test d'antibiotique contre <i>E. coli</i> et <i>P. aeruginosa</i>	89
Figure 38 :	Résultats de l'activité antifongique du les extraits de <i>Thapsia garganica</i> contre l' <i>Aspargillus flavus</i>	90
Figure 39 :	Résultats de l'activité antifongique du les extraits de <i>Thapsia garganica</i> contre le <i>Penicillium purpurogenum</i>	90
Figure 40 :	Suivie de la température des lapins.....	91
Figure 41 :	Suivie de nombre des colonies.....	91
Figure 42 :	Taille horizontale des plaies (cm).....	92
Figure 43 :	Taille verticale des plaies (cm).....	92

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
Tableau 01 :	Classes les plus importantes des composés phénoliques dans les plantes.....	05
Tableau 02 :	Classes des flavonoïdes.....	07
Tableau 03 :	Classification du <i>Thapsia garganica</i>	19
Tableau 04 :	Classification phylogénétique du <i>Prunus persica</i> L.....	24
Tableau 05 :	Paramètres géographiques et bioclimatiques des stations d'étude.....	28
Tableau 06 :	Différents extraits préparés.....	34
Tableau 07 :	Provenance des souches bactériennes testées.....	49
Tableau 08 :	Rendement et caractéristiques des différents extraits préparés à partir de <i>Thapsia garganica</i> L. et <i>Prunus persica</i> L.....	57
Tableau 09 :	Résultats des analyses physiques d'huile essentielle des feuilles de TG.....	58
Tableau 10 :	Résultats des analyses chimiques d'huile essentielle de <i>thapsia garganica</i>	58
Tableau 11 :	Regroupement des fractions issues de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait éthérique de la plante PP.....	59
Tableau 12 :	Regroupement des fractions issues de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait d'acétate d'éthyle de la plante PP.....	60
Tableau 13 :	Regroupement des fractions issues de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait d'acétate d'éthyle de la plante TG.....	60
Tableau 14 :	Composition chimique (%) des composés identifiés des huiles essentielles des feuilles de <i>Thapsia garganica</i>	61
Tableau 15 :	Données RMN ¹ H à 300 MHz, ¹³ C à 75 MHz dans le DMSO du composé PPAE4.....	72
Tableau 16 :	Données expérimentales RMN (ppm) de composé PPAE4 comparées aux données de la littérature.....	74
Tableau 17 :	Coordonnées cinétiques de réduction du DPPH• (PP).....	84
Tableau 18 :	Coordonnées cinétiques de réduction du DPPH• (TG).....	84
Tableau 19 :	Constituants majoritaires issus des huiles essentielles de la plante <i>Thapsia garganica</i> en comparaison avec la littérature.....	95
Tableau 20 :	Les déplacements chimiques (¹ H, ¹³ C) et les corrélations dans la littérature....	96
Tableau 21 :	Comparaison des teneurs en polyphénols de la plante <i>Prunus persica</i> avec la littérature.....	98
Tableau 22 :	Comparaison des teneurs en polyphénols de la plante <i>Thapsia garganica</i> avec la littérature.....	99

TABLE DES MATIERES

Dédicaces	I
Remerciements	II
المخلص	IV
Résumé	V
Abstract	VI
Abréviations	VIII
Liste des figures	IX
Liste des tableaux	XI
Table des matières	XII
Introduction générale	1

CHAPITRE 01 : Synthèse bibliographique

I.	Métabolites secondaires	4
I.1.	Les polyphénols	4
I.1.1.	Rôle et intérêt des composés phénoliques	5
I.2.	Les flavonoïdes	6
I.2.1.	Structure des flavonoïdes	6
I.2.2.	Propriétés antioxydantes et piègeurs de radicaux libres	6
I.2.3.	Classification des flavonoïdes	7
I.3.	Les tannins	8
I.3.1.	Structure chimique des tannins	8
I.3.2.	Classification des tannins	9
I.3.3.	Propriétés biologiques des tannins	10
I.4.	Les saponosides	10
I.4.1.	Classification des saponosides	10
I.4.2.	Structure des saponosides	11
I.5.	Les alcaloïdes	11
I.6.	Les huiles essentielles	12
I.6.1.	Classification des huiles essentielles	12
II.	Activité biologique des plantes	13
II.1.	Méthodes d'évaluation e l'activité antioxydante	13
II.1.1.	Radicaux libres, stress oxydatif	13
II.1.2.	Test de piégeage du radical libre DPPH	14
II.1.3.	Test de réduction de fer (FRAP)	14
II.2.	Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne	15
II.2.1.	Activité antimicrobienne des extraits des plantes	15
II.2.2.	La méthode de diffusion sur disque	16
II.2.3.	Méthode de la croissance radiale sur milieu solide	16

CHAPITRE 02 : Présentation des plantes étudiées

I.	<i>Thapsia garganica</i> L.....	17
I.1.	Généralités sur les apiacées.....	17
I.2.	Définition de genre <i>Thapsia garganica</i>	17
I.3.	Description de la plante.....	18
I.4.	Classification systématique.....	19
I.5.	Synonymes	19
I.6.	Noms usuels.....	19
I.7.	Écologie, répartition.....	20
I.8.	Utilisations populaires.....	20
I.9.	Cytotoxicité.....	22
I.10.	Toxicité.....	22
I.11.	Composition chimique.....	22
II.	<i>Prunus persica</i> L.....	23
II.1.	Généralités sur les rosacées.....	23
II.2.	Historique et origine.....	24
II.3.	Noms usuels.....	24
II.4.	Classification systématique.....	24
II.5.	Description de la plante <i>Prunus persica</i>	25
II.6.	Répartition géographique.....	25
II.7.	Ecologie.....	25
II.8.	Parties utilisées.....	25
II.9.	Composition et valeur nutritionnelle.....	26
II.10.	Composition chimiques.....	26
II.11.	Utilisations thérapeutiques.....	27
II.12.	Toxicologie.....	27

CHAPITRE 03 : Matériel et méthodes

I.	Matériel végétal, criblage phytochimique, extraction.....	28
I.1.	Critères de choix des plantes étudiées.....	28
I.2.	Echantillonnage.....	28
I.2.1.	Récolte de deux plantes.....	28
II.	Criblage phytochimique.....	29
II.1.	Préparation des extraits.....	29
II.2.	Tests phytochimiques sur l'extrait éthérique.....	30
II.3.	Tests phytochimiques sur l'extrait méthanolique.....	31
II.4.	Tests phytochimique sur l'extrait aqueux.....	32
III.	Préparation des extraits sélectifs.....	33
III.1.	Préparation des extraits bruts méthanoliques.....	34
III.2.	Dégraissage du matériel végétal.....	34
III.3.	Extraction des flavonoïdes.....	34
III.4.	Extraction des tanins.....	35
III.5.	Extraction des saponosides.....	35

TABLE DES MATIERES

III.6.	Extraction des alcaloïdes.....	35
III.7.	Extraction des huiles essentielles.....	36
IV.	Calcul des rendements.....	36
V.	Analyses des propriétés physico-chimiques des huiles étudiées.....	36
V.1.	Indices chimiques.....	36
V.1.1.	Indice d'acide.....	36
V.1.2.	Indice de saponification.....	37
V.1.3.	Indice d'ester.....	38
V.1.4.	Indice de peroxyde.....	38
V.2.	Indices physiques.....	39
V.2.1.	Pouvoir rotatoire.....	39
V.2.2.	Densité relative à 20 °C.....	39
V.2.3.	Indice de réfraction.....	39
VI.	Analyses spectroscopiques et chromatographiques.....	40
VI.1.	Analyses par Chromatographie sur couche mince.....	40
VI.2.	Séparation des flavonoïdes et des tanins par Chromatographie sur Colonne (CC).....	40
VI.3.	Identification des extraits par Spectroscopie Infrarouge.....	40
VII.	Analyses chromatographiques d'huile essentielle des feuilles de <i>Thapsia garganica</i>	41
VII.1.	Analyse des extraits séparés par résonance magnétique nucléaire (RMN ¹ H, RMN ¹³ C).....	41
VII.2.	Détermination de la teneur en polyphénols.....	43
VII.3.	Dosage des composés phénoliques totaux.....	43
VII.4.	Dosage des flavonoïdes totaux.....	44
VII.5.	Dosage des tanins condensés.....	45
VIII.	Evaluation de l'activité antioxydante.....	46
VIII.1.	Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil).....	46
VIII.1.1.	Test qualitative HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography).....	46
VIII.1.2.	Test antioxydant au DPPH (quantification spectrophotométrique).....	46
VIII.2.	Suivi cinétique de l'activité anti-radicalaire par le test au DPPH•.....	47
VIII.3.	Méthode de FRAP (réduction de fer).....	49
IX.	Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	50
IX.1.	Activité antibactérienne (Méthode de diffusion sur disque).....	50
IX.2.	Evaluation de l'activité antifongique.....	52
X.	Activité antibactérienne <i>in-vivo</i> (effet de cicatrisation).....	54
X.1.	Les extraits testés.....	54
X.2.	L'animal expérimental.....	54
X.3.	L'aliment.....	54
X.4.	Hygiène et prophylaxie.....	54
X.5.	Contrôle effectué.....	54
X.6.	Excision chirurgicale des lambeaux cutanés.....	55
X.7.	Traitement des plaies.....	55

TABLE DES MATIERES

X.8.	Evaluation des paramètres (Température et cicatrisation).....	55
X.9.	Evaluation du processus cicatriciel (photographie, planimétrie des plaies)	55
XI.	Analyses statistiques.....	56

CHAPITRE 04 : Résultats

I.	Résultat du criblage phytochimique.....	57
II.	Rendements des extraits.....	57
III.	Résultats des analyses physico-chimiques des huiles essentielles de TG....	58
IV.	Résultats des analyses chimiques des différents extraits par les techniques spectroscopiques et chromatographiques.....	59
IV.1.	Chromatographie sur couche mince.....	59
IV.2.	Les résultats de la chromatographie sur colonne CC.....	59
IV.3.	Résultats des analyses chromatographiques d'huile essentielle des feuilles de TG.....	60
IV.4.	Structures chimiques avec nomenclatures des composés majoritaires identifiées dans l'huile essentielle de TG.....	66
IV.5.	Résultats d'identification des groupements fonctionnels par spectroscopie Infra-Rouge.....	69
V.	Résultats des analyses spectroscopiques par RMN 1H et RMN 13C.....	72
VI.	Les résultats de dosage des acides phénoliques.....	75
VI.1.	Résultats de dosage des polyphénols.....	75
VI.2.	Résultats de dosages des flavonoïdes.....	76
VI.3.	Résultats de dosage des tanins condensés.....	78
VII.	Résultats de l'activité antioxydante.....	79
VII.1.	Piégeage de DPPH.....	79
VII.2.	Suivi cinétique de l'activité anti-radicalaire par le test au DPPH•.....	82
VII.3.	Résultat du test d'activité antioxydante (méthode de FRAP).....	85
VIII.	Résultats de l'activité antimicrobienne.....	86
VIII.1.	Résultats de l'activité antibactérienne.....	86
VIII.2.	Test des antibiotiques.....	89
VIII.3.	Résultats de l'activité antifongique.....	89
IX.	Résultats de l'activité antibactérienne <i>in-vivo</i>	91

CHAPITRE 05 : Discussion générale.....	93
--	----

Conclusion générale.....	107
--------------------------	-----

Références bibliographiques.....	110
----------------------------------	-----

Annexes.....	
--------------	--

Publication et communications.....	
------------------------------------	--



Introduction générale

Les produits d'origine naturelle prennent de plus en plus une place importante dans l'industrie pharmaceutique et agronomique. Les stratégies de recherche de substances naturelles actives à partir de plantes sont souvent basées sur des approches ethnobotaniques, mettant en avant l'utilisation de ces plantes en médecine traditionnelle par les populations locales (**Sahli, R., 2017**).

Les plantes représentent une source inépuisable de remèdes traditionnels et efficaces grâce aux principes actifs qu'elles contiennent : alcaloïdes, flavonoïdes, hétérosides, saponosides, quinones, vitamines... et huiles essentielles (**Ouis, N., 2015**).

Ces métabolites secondaires exercent une action déterminante sur l'adaptation des plantes à leur environnement. Ils participent ainsi, de manière très efficace, à la tolérance des végétaux à des stress variés (attaques de pathogènes d'insectes, sécheresse, lumière UV...) (**Hadj Salem, J., 2009**).

Les plantes ne sont pas toujours sans danger, elles paraissent anodines mais peuvent se révéler toxiques ou mortelles pour l'organisme. Beaucoup de plantes médicinales et de médicaments sont thérapeutiques à une certaine dose et toxiques à une autre (**Boumediou, A. S. M. A., & Addoun, S., 2017**).

La recherche sur les antioxydants est un sujet important dans le domaine médical ainsi que dans l'industrie alimentaire. Par conséquent, les antioxydants avec des activités de piégeage des radicaux libres peuvent avoir une grande pertinence dans la prévention et le traitement des maladies dans lesquelles des oxydants ou des radicaux libres sont impliqués. (**M. R. Saha & al., 2008**)

Les produits phytochimiques sont connus pour posséder une activité antioxydante, antibactérienne, antifongique, antidiabétique, anti-inflammatoire, antiarthritique et radioprotectrice, et en raison de ces propriétés, ils sont largement utilisés à des fins médicinales (**Gupta, A. et al., 2012**).

En raison de l'effet secondaire des produits chimiques antimicrobiens et de la résistance que les micro-organismes pathogènes établissent contre les antibiotiques, beaucoup d'attention a été prêtée aux extraits bruts des plantes qui commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives (**Yakhlef, G. et al., 2011, Gbogbo, K. A. et al., 2013**).

L'extraction de principes actifs à haute valeur ajoutée à partir de la matière végétale, notamment le cas des polyphénols, qui suscitent actuellement beaucoup d'intérêt grâce à leur

pouvoir antioxydant, est une étape très importante dans l'isolement aussi bien que dans l'identification des composés phénoliques (**Mahmoudi, S. et al., 2013**).

Afin d'isoler des substances nouvelles de plantes et de trouver de ce fait de nouvelles molécules naturelles bioactives tant dans le traitement des maladies infectieuses et des tumeurs, et afin de rendre la stratégie d'isolement le plus efficace, il convient de sélectionner avec soin les plantes à étudier.

Le but de cette étude consiste à renforcer la connaissance phytochimique des extraits de deux plantes médicinales *Prunus persica* L. (Rosacées) et *Thapsia garganica* L. (Apiacées), et de mettre en évidence de traceurs spécifiques pour chacune de ces plantes en vue de l'utilisation ultérieure de leurs extraits autant que agents antioxydants et antimicrobiens.

Les Rosacées représentent une grande famille cosmopolite de plantes à fleurs, spécialement représentée dans les régions tempérées de l'hémisphère Nord. Elle comprend aussi bien des plantes herbacées vivaces que des arbustes ou des arbres. Elle compte 100 à 115 genres et plus de 3000 espèces différentes (**Heywood, V. H., 1993 ; Spichiger, R. E. et al., 2002**).

Les Apiacées renferme de nombreuses espèces économiquement importantes, certaines sont des plantes alimentaires (carotte, fenouil, céleri...), d'autres sont des condiments utilisés depuis longtemps en cuisine à cause des huiles essentielles produites par leurs canaux sécréteurs (persil, coriandre, carvi...). En phytothérapie, on leur attribue principalement des propriétés digestives (**Reynaud, 2002**).

L'objectif général de ce travail est d'étudier la composition chimique et les propriétés antioxydantes et antimicrobiennes de quelques métabolites secondaires extraites de deux plantes médicinales *Prunus persica* L. (feuilles) et *Thapsia garganica* L. (feuilles et racines). Pour atteindre cet objectif, les démarches spécifiques suivant ont été dégagés :

- Détermination des différents phytoconstituants par criblage phytochimique ;
- Extraction sélective des familles prépondérantes notamment les flavonoïdes, les tanins, les saponosides, les alcaloïdes et les huiles essentielles ;
- Etude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles ;
- Analyse de la composition chimique de ces extraits par chromatographie sur couche mince ;
- Fractionner les extraits des flavonoïdes et des tanins par chromatographie sur colonne ;
- Identification des fractions isolées par les méthodes spectroscopiques (IR, RMN¹H, RMN¹³C, CPG/SM) ;

- Dosage des polyphénols, flavonoïdes et tanins.
- Evaluation de l'activité antioxydante par les techniques :
 - Test au DPPH, et l'étude de la cinétique de la réaction de piégeage de ce radical.
 - La méthode de FRAP.
- Etudier le pouvoir antibactérien et antifongique in-vitro des différents extraits ;
- Tester l'activité antibactérienne de quelques extraits in-vivo sur des lapins.

En vue de rendre compte de la démarche scientifique adoptée, ce manuscrit comportera trois parties :

- 1- Dans une première partie, une revue bibliographique sera présentée sur les métabolites secondaires ;
- 2- La deuxième partie du manuscrit présentera la description des espèces végétales utilisées dans ce travail ;
- 3- La troisième partie présentera le matériel et les méthodes utilisées, Les résultats obtenus, suivis de la discussion puis la conclusion et les perspectives.



CHAPITRE 01

Synthèse bibliographique

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches basées sur les cultures *in vivo* et *in vitro* de tissus végétaux. Ceci est notamment le cas des polyphénols végétaux qui sont largement utilisés en thérapeutique comme vasculoprotecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et antiradicalaires (**Bahorun, 1997**).

I. Métabolites secondaires :

Les métabolites secondaires se définissent comme les molécules produites par des organismes vivants (plantes, champignons, bactéries...) ne jouant pas de rôle direct pour les fonctions vitales de l'organisme, c'est-à-dire la nutrition, la croissance, et la reproduction. Les métabolites secondaires interviennent en particulier dans l'évolution, la survie des espèces, ainsi que dans les interactions entre individus de la même espèce ou d'espèces différentes, par leur implication dans les phénomènes de défense, de symbiose ou de pollinisation par exemple (**Houël, E., 2011**).

I.1. Les polyphénols :

Les phénols totaux sont des métabolites secondaires synthétisés par les plantes pendant leur développement mais aussi comme réponse aux conditions de stress tels qu'infections, blessures, radiation UV. En se basant sur le nombre des sous-unités de phénols, la classification actuelle forme deux groupes : des phénols simples et des polyphénols (**Atanasova, M., & Ribarova, F., 2010**).

Les acides phénoliques naturels sont des phénylpropanoïdes avec un cycle aromatique et une chaîne latérale à trois atomes de carbone. Les acides caféique, férulique et p-coumarique, comme les acides hydroxycinnamiques, sont presque omniprésents. Les acides phénoliques sont distribués dans la nature sous leurs formes libres et liées, sous forme d'esters et de glycosides (**Plazonić, A. et al. 2009**).

Les composés phénoliques ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés) (**Urquiaga et Leighton, 2000 ; Macheix et al, 2005**).

Ils forment une immense famille de plus de 8000 composés naturels qui sont divisés en plusieurs catégories : les flavonoïdes, les tanins, les acides phénoliques, les coumarines, les lignanes et d'autres classes existent en nombres considérables (**Dacosta, 2003**).

Tableau 01 : Les classes les plus importantes des composés phénoliques dans les plantes (Seghiri, R., 2009).

Nombre d'atomes de carbone	Squelette de base	Classe
6	C6	Phénols simples, benzoquinones
7	C6 – C1	Acides phénoliques
8	C6 – C2	Acétophénone, acide phénylacétique
9	C6 – C3	Acide hydroxycinnamique, polypropène, coumarine, isocoumarine
10	C6 – C4	Naphtoquinone
13	C6 – C1– C6	Xanthone
14	C6 – C2– C6	Stilbène, anthraquinone
15	C6 – C3– C6	Flavonoïdes, isoflavonoïdes
18	(C6 – C3) 2	Lignanes, neolignanes
30	(C6 – C3– C6) 2	Biflavonoïdes
n	(C6 – C3) 2 (C6) n (C6 – C3– C6) n	Lignines Catecholmelanine (Tannins condensés)

I.1.1. Rôle et intérêt des composés phénoliques :

Le rôle des composés phénoliques est largement montré dans la protection contre certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes (Macheix, J. J., et al, 2005).

Afin de combattre et de neutraliser les effets délétères des espèces réactives de l’oxygène (ERO), diverses stratégies antioxydantes ont été évoluées ; en augmentant les défenses enzymatiques antioxydantes endogènes et/ou en renforçant les défenses non enzymatiques par des moyens diététiques ou pharmacologiques (Li, A. N., et al., 2014).

Ces substances suscitent beaucoup d’intérêts dans plusieurs domaines, celui de la nutrition par leur caractère préventif à l’égard de diverses maladies (les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives et divers cancers), en cosmétologie et surtout dans les industries agroalimentaires par leurs implications, en particulier, sur la saveur des aliments et leur incidence sur la conservation des produits alimentaires. (Achat, S., 2013).

Dans cette étude, nous décrivons la classe des flavonoïdes, tannins, saponosides, alcaloïdes et les huiles essentielles, car elles ont été ciblées pour l'extraction et l'analyse.

I.2. Les flavonoïdes :

Le nom flavonoïde est dérivé du mot «Flavus» en latin, qui signifie jaune. L'intérêt nutritionnel pour les flavonoïdes date de la découverte de la vitamine C (Julien.F, 2002).

I.2.1. Structure des flavonoïdes :

Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et ils possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbone constitué de deux unités aromatiques, de cycle en C₆ (A et B), reliés par une chaîne en C₃ (figure 01) (Bruneton, 1999).

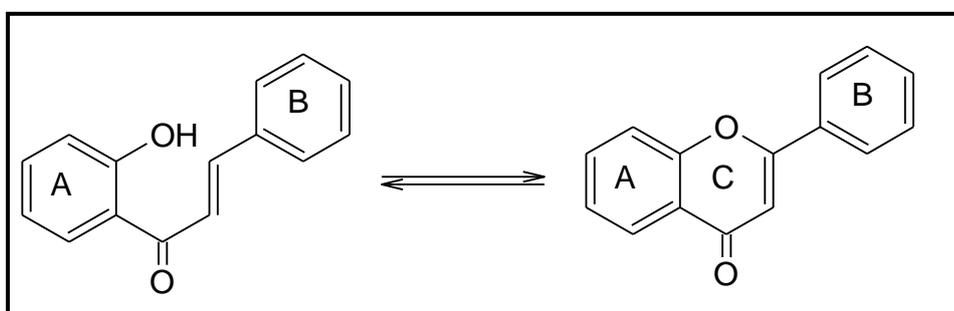
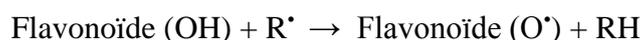


Figure 01 : Structure de base d'un flavonoïde.

I.2.2. Propriétés antioxydantes et piègeurs de radicaux libres :

La propriété des flavonoïdes la mieux décrite est leur activité antioxydante et leur capacité à piéger les radicaux libres : radicaux hydroxyles (OH[•]), anions superoxydes (O₂^{•-}) et radicaux peroxy lipidiques, selon la réaction suivante :



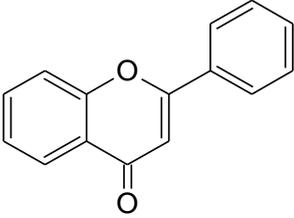
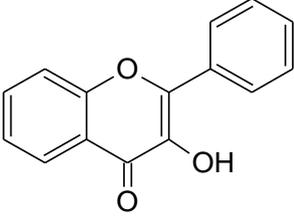
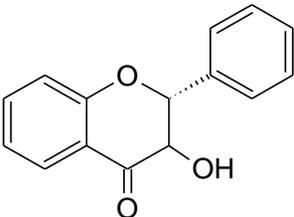
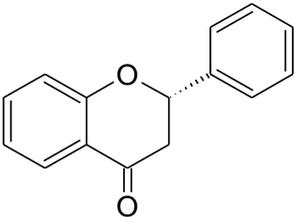
Les radicaux libres apparaissent dans plusieurs situations, telles que :

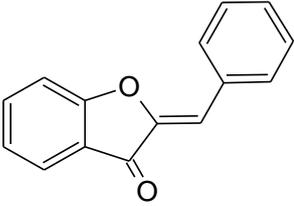
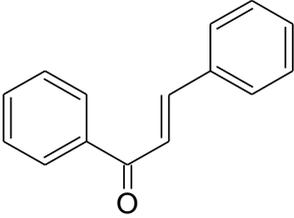
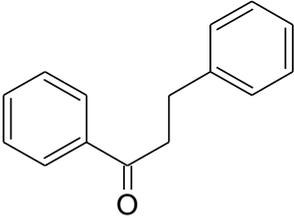
- l'anoxie : qui engendre la production de l'anion superoxyde (O₂^{•-}),
- l'inflammation : qui correspond à la production d'anions superoxydes (O₂^{•-}) par la NADPH-oxydase membranaire des leucocytes activés, et, par dismutation, à celle du très réactif radical hydroxyle (OH[•]),
- l'auto-oxydation des lipides : c'est au cours du stress oxydant que les espèces radicalaires, libres de tout contrôle, vont attaquer des cibles bioactives telles que les protéines, altérant ainsi les récepteurs cellulaires et les enzymes, les acides nucléiques (favorisant la survenue des mutations délétères à l'origine de divers cancers) et les lipides (Ghedira, K., 2005).

1.2.3. Classification des flavonoïdes :

Les flavonoïdes se divisent en 6 groupes : flavones, flavonols, flavonones, isoflavones, chalcones, auronnes.

Tableau 2 : Les classes des flavonoïdes (Berigaud M., 2002)

Flavonoïdes				
Classe	Squelette	Aglycones	Hétérosides	Dérivés méthoxylés
Flavone	 <p>2-phénylchromen-4-one</p>	Luteole Apigenol	Apiine	Tangéritine Nobilétine
Flavonol	 <p>3-hydroxy-2-phénylchromen-4-one</p>	Quercetol Kaempferol Myricetol Fisetol	Rutine	Pachipodol Rhamnazine
Flavanonol	 <p>3-hydroxy-2,3-dihydro-2-phénylchromen-4-one</p>	Dihydrokaempferol Dihydroquercetol	Hépéridine Naringine	
Flavanone	 <p>dihydro-2-phénylchromen-4-one</p>	Naringetol Criodictyol Butine		Hesperétine Homoeriodictyol

Aurone		Hispidol Aureusidine Sulfurétine Maritimétine		
Chalcone		Isoliquiritigénine Butéine		Xanthohumol
Dihydro-chalcone		Phlorétine	Aspalatine	

I.3. Les tannins :

Les tannins sont des composés organique complexe présent dans pratiquement toutes les plantes a des concentrations diverses. Ils sont souvent contenus dans l'écorce ou dans les feuilles. Les tanins peuvent former des complexe indestructibles avec certains tissu corporels comme la peau ce qui permet de les resserrer. En conséquence. Ces substances peuvent être utilisées pour tanner le cuir, ou encore à des fins thérapeutiques pour traiter la diarrhée ou leur propriété de coaguler les albumines muqueuses et des tissus (**P. Iserin et al., 2001**).

I.3.1. Structure chimique des tannins :

La structure complexe des tannins condensés est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leur centre asymétrique et leur degré d'oxydation. Les formes naturelles monomériques des flavan-3-ols se différencient par la stéréochimie des carbones asymétrique C₂ et C₃ et par le niveau d'hydroxylation du noyau B. On distingue ainsi les catéchines (di hydroxylées) des gallos catéchines (trihydroxylées) (**Hemingway, R. W., 1989**).

I.3.2. Classification des tannins :

On distingue deux grands groupes de tannins :

➤ **Les tanins condensés, non hydrolysables ou tanins catéchiques :**

Les tanins condensés sont des polymères d'unités flavaniques, le plus souvent liées entre elles par des liaisons C4-C8. Les précurseurs sont des flavan-3-ols (catéchine et épicatechine) et des flavan-3,4diols (Zimmer, N., & Cordesse, R., 1996).

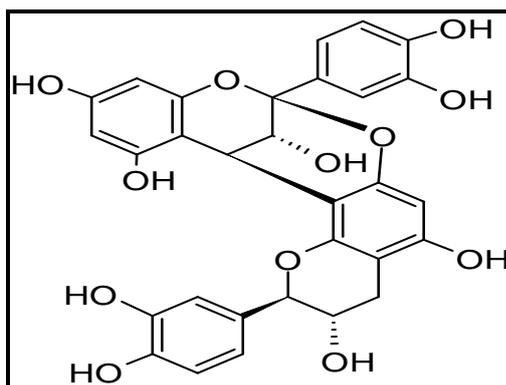


Figure 02 : Structure d'un tannin condensé.

➤ **Les tanins hydrolysables :**

Les tanins hydrolysables sont des esters d'un sucre simple (glucose ou xylose principalement) et d'acides phénoliques. Ils peuvent être dégradés par hydrolyse chimique (acide ou alcaline) ou enzymatique. Les acides phénoliques libérés sont l'acide gallique dans le cas des gallotannins et l'acide ellagique dans le cas des ellagitannins (figure 7) (Derbel, S., & Ghedira, K., 2005).

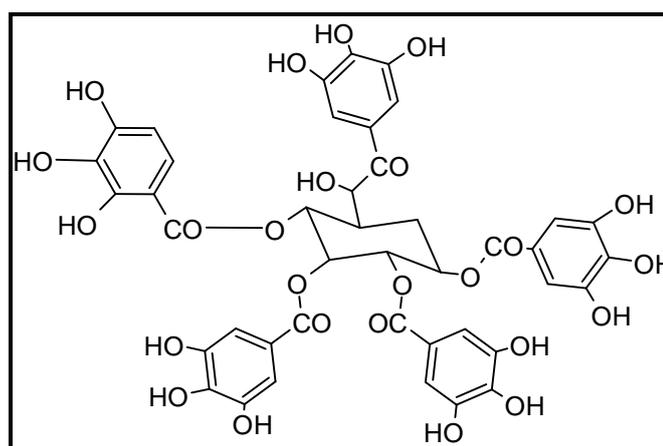


Figure 03 : Exemple d'un tannin hydrolysable.

I.3.3. Propriétés biologiques des tannins :

Les tannins sont des métabolites secondaires des plantes, leur conférant une protection contre les prédateurs (herbivores et insectes). La propriété astringente des tannins est à la base d'autres propriétés (vulnéraire, anti diarrhéique...), elle permet la cicatrisation, l'imperméabilisation de la peau et des muqueuses, favorise la vasoconstriction des petits vaisseaux. En outre, les tanins ont un très grand pouvoir antibactérien, antiviral, anti-inflammatoire et une activité antimutagène. Les plantes riches en tannins sont utilisées dans les cas de rhume, le maux de gorge, les problèmes de sécrétions trop importantes, les infections internes ou externes, blessures, coupures et brûlures (Paolini V., *et al.*, 2003).

I.4. Les saponosides :

Les saponosides constituent un vaste groupe d'hétérosides très fréquents chez les végétaux. Ils se caractérisent par des effets tensio-actifs leur conférant la propriété de former des solutions moussantes lorsqu'ils sont dissous dans l'eau. Ils peuvent être classés en deux groupes selon la nature de leur génine qui peut être stéroïdique ou triterpénique. Les génines stéroïdiques possèdent un squelette en C27 et six cycles. Les saponosides stéroïdiques sont rencontrés dans de nombreuses plantes. Il semble que les saponosides jouent un rôle de défense du végétal contre les pathogènes microbiens (Krief, S., 2003).

Les saponines ou saponosides sont des composés produits naturellement par certaines plantes, caractérisées par leurs propriétés tensioactives leur conférant un pouvoir moussant. Différentes saponines isolées comportent des propriétés immunomodulatrice, cytotoxique, antitumorale, anti-inflammatoire, antifongique, antivirale, expectorante pour ne citer que les principales propriétés (Nkwokap, G. B. K., 2010).

I.4.1. Classification des saponosides :

➤ Les saponosides triterpéniques :

Les triterpènes, 4000 composés construits sur plus de 40 squelettes différents sont des composés en C30 issus de la cyclisation du 3S-2,3-époxy-2,3-dihydrosqualène ou, plus rarement du squalène lui-même.

➤ Les saponosides stéroïdiques :

Les génines stéroïdiques possèdent toutes un squelette à 27 atomes de carbone qui comportent habituellement six cycles (Nkwokap, G. B. K., 2010).

I.4.2. Structure des saponosides :

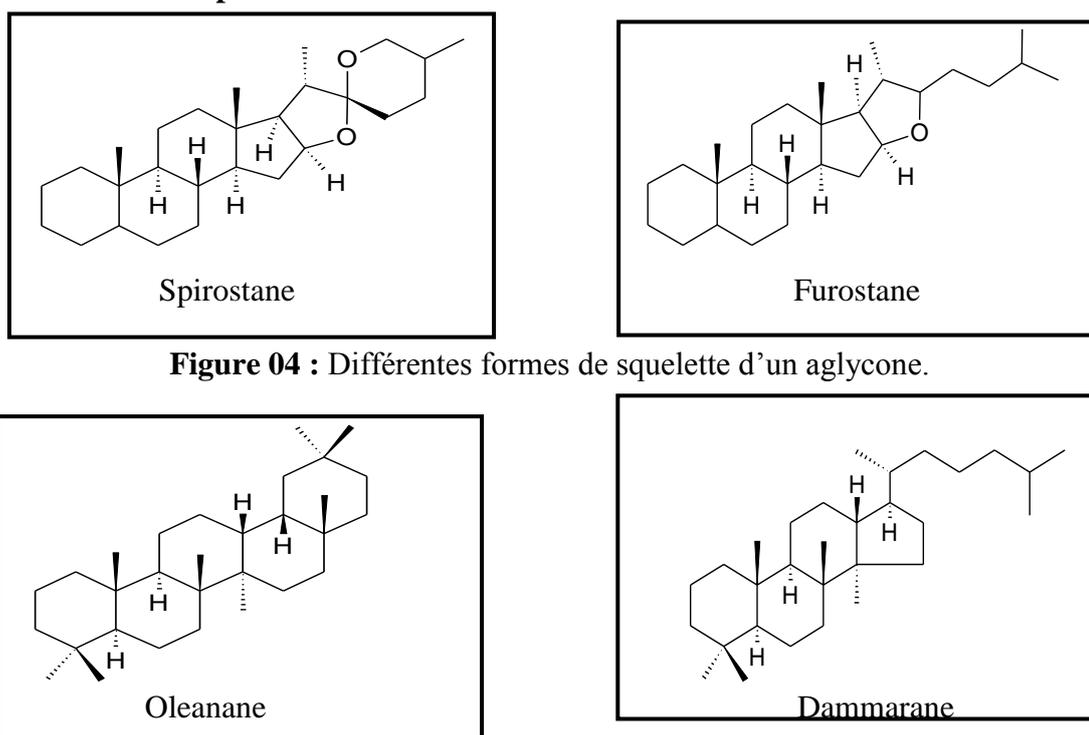


Figure 05 : Structure de bases des saponosides (Betina-Bencharif, S., 2014).

I.5. Les alcaloïdes :

Les alcaloïdes sont un groupe de composés azotés et faiblement basiques issus principalement des végétaux. Ils présentent des réactions communes de précipitation. Après extraction, ils sont détectés par des réactions générales de précipitation fondées sur leur capacité de se combiner avec des métaux. (Kansole, M. M. R., 2009).

Bien qu'il soit difficile de donner une bonne définition des alcaloïdes, en raison de nombreux cas particuliers, on peut écrire que les alcaloïdes (littéralement « composés qui ressemblent à un alcali ») sont des composés d'origine naturelle azotés basiques à fortes activités biologiques, toxique pour la plupart, qui sont extraites en majorité des plantes à fleurs (8,7% des *phanérogames*, *dicotylédones*), mais aussi :

- ✓ Des champignons (ex. : ergine de l'ergot du seigle) ;
- ✓ Des mousses (ex. : lycodine de *Lycopodium complanatum*) ;
- ✓ Des bactéries (ex. : pyocyanine de *Pseudomonas aeruginosa*) ;
- ✓ Des animaux supérieurs (ex. : adrinaline, castoramine du musc).

Leurs noms triviaux dérivent, soit du nom du chimiste qui les isolés comme la pelletière (de *Pelletier*), soit des plantes dont elles sont extraites comme la cocaïne de la *Coca*, soit de l'activité biologique qui les caractérise comme l'émétine (un émétique, composé qui provoque le vomissement (Milcent, R., & Chau, F., 2012).

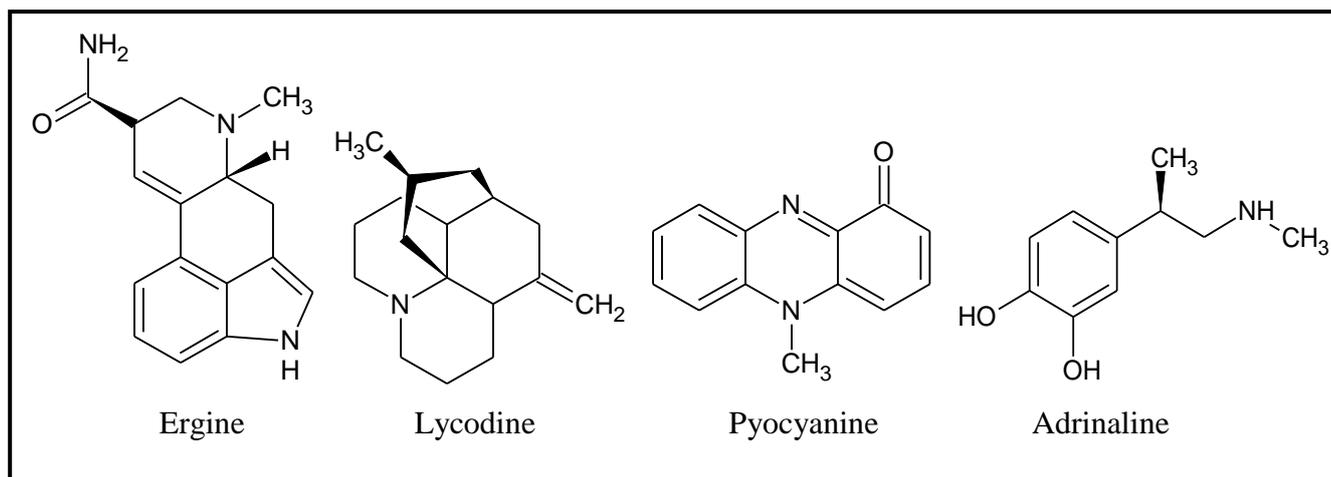


Figure 06 : Structures de quelques alcaloïdes.

1.6. Les huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont des mélanges naturels complexes de métabolites secondaires volatils, isolés par hydrodistillation ou par expression mécanique. Elles sont obtenues à partir de feuilles, de graines, de bourgeons, de fleurs de brindilles, d'écorces, de bois, de racines, de tiges ou de fruits, mais également à partir de gommages qui s'écoulent du tronc des arbres. Les huiles essentielles sont obtenues par hydrodistillation, expression à froid, comme les agrumes. De nouvelles techniques permettant d'augmenter le rendement de production, ont été développées, comme l'extraction au moyen de dioxyde de carbone liquide à basse température et sous haute pression ou l'extraction assistée par ultrasons ou micro-ondes (Toure, D., 2015).

La norme AFNOR NFT75-006 définit l'huile essentielle (HE) comme «un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par hydrodistillation, soit à partir des fruits de citrus par des procédés mécaniques. Les HE sont ensuite séparées de la phase aqueuse par des procédés physiques» (Mnayer, D., 2014).

Les huiles essentielles (HE) représentent une source intrinsèquement de terpènes naturels, utilisés dès le début de la civilisation humaine sous forme de cultures aromatiques. Leur première production documentée est localisée dans l'Égypte ancienne au 3^{ème} millénaire avant JC. (Evergetis, E., & Haroutounian, S. A., 2014).

1.6.1. Classification des huiles essentielles :

Les huiles essentielles font partie du monde des substances aromatiques, ce sont les produits volatils extraits des plantes par distillation à la vapeur d'eau. Parfois ces produits odorants peuvent être extraits en utilisant d'autres procédés techniques comme l'extraction par solvant organique, le pressage, l'enfleurage etc...

L'état de nos connaissances actuelles permet de classer les constituants des huiles essentielles en quatre groupes :

- 1) Les terpènes.
- 2) Les hydrocarbures linéaires.
- 3) Les dérivés du benzène.
- 4) Les divers composés contenant du soufre ou de l'azote (plus rares) (**Jean, F. I. (1992)**).

II. Activité biologiques des plantes :

II.1. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante :

II.1.1. Radicaux libres, stress oxydatif :

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense. Il est maintenant admis que le phénomène de stress oxydant est impliqué dans l'étiologie de nombreuses maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson, Huntington), de désordres pathologiques, mais également dans les phénomènes de vieillissement (**Bouchouka, E., 2016**).

Selon le règlement européen CE/1333/2008 : " Les antioxydants sont "des substances qui prolongent la durée de conservation des denrées alimentaires en les protégeant des altérations provoquées par l'oxydation, telles que le rancissement des matières grasses et les modifications de couleur".

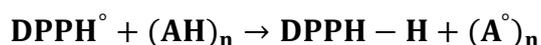
L'organisme doit confronter et contrôler la présence des antioxydants et des pro-oxydants continuellement, ces derniers sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable. Le stress oxydant est le terme se rapportant au déséquilibre entre la génération des oxydants et l'activité des défenses anti-oxydantes, qui pourrait mener aux dommages oxydants. C'est une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive des espèces radicalaire toxiques (**Trabsa, H., 2015**).

Plusieurs méthodes sont utilisées pour la détermination de l'activité antioxydant, nommées d'après le nom de la substance utilisée comme source de radicaux libres, par exemple: FRAP (Ferric reducing antioxidant power), ORAC (oxygen radical absorbance capacity), TEAC (Trolox équivalent antioxidant capacity) ou ABTS (2,2-azinobis 3-ethylbenzothiazoline 6-sulphonate) et DPPH⁺ (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl),...etc. Il est à indiquer que différentes méthodes donnent des résultats assez différents et devraient être appliquées préférentiellement pour la comparaison de produits similaires (**Silviya Georgieva, L., & Angelov, G., 2010**).

II.1.2. Test de piégeage du radical libre DPPH :

Le DPPH (2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl) est généralement le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radical libre et la simplicité de l'analyse (Kholkhal, F. *et al.*, 2013).

Le DPPH (figure 07) est un radical stable et il présente en solution une absorption caractéristique à 517 nm qui lui confèrent une coloration violette. Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit par un capteur de radicaux libres. On peut résumer cette réaction par l'équation suivante :



Où (AH)_n représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en molécule DPPH-H (jaune) (Brand-Williams, W. *et al.*, 1995).

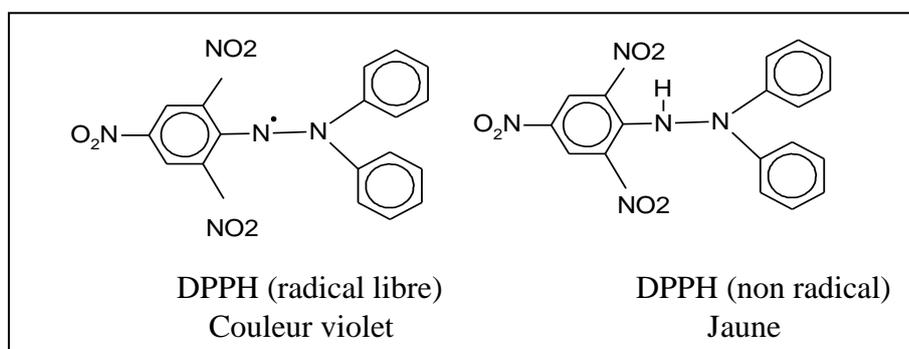


Figure 07 : Forme libre et réduite du DPPH (Brand-Williams, W. *et al.*, 1995).

Le test au radical DPPH est généralement utilisé pour les composés, qui contiennent les groupements donneurs d'hydrogène, comme R₂-NH, R-OH et R-SH. Lorsque le DPPH[•] réagit avec un antioxydant, un atome d'hydrogène vient se fixer sur le radical, ce qui entraîne une perte de couleur. C'est ce qui permet le suivi de l'efficacité d'un antioxydant par spectrophotométrie (Guillouty, A., 2016).

II.1.3. Test de réduction de fer (FRAP) :

La méthode FRAP est un dosage colorimétrique du transfert d'électrons, basée sur la capacité des produits testés à réduire le fer (le passage de la forme ferrique à ferreux). Elle consiste à observer après quatre minutes le changement d'absorbance à 593 nm dû à la réduction du complexe Fe³⁺- TPTZ (fer 2,4,6-tripyridyls-triazine) et l'apparition d'une couleur bleue (Tolba, I., 2016) (Figure 08).

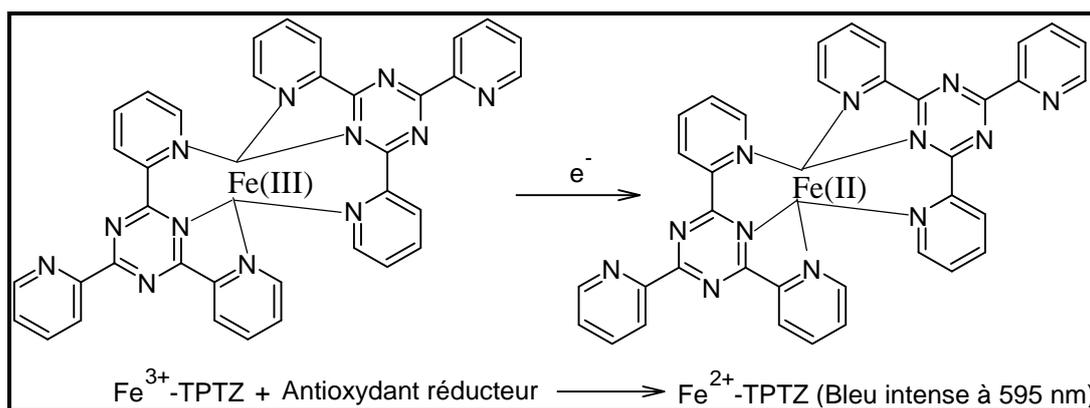


Figure 08 : Réaction de la méthode FRAP (Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K., 2005).

La capacité de réduction mesurée ne reflète pas nécessairement l'activité antioxydante. Au lieu de cela, il fournit une concentration «totale» très bénéfique d'antioxydants, sans mesurer ni mettre en commun la concentration de tous les antioxydants impliqués. La méthode a été appliquée à l'origine au plasma mais a été étendue à d'autres fluides biologiques, aliments, extraits de plantes, jus, etc... (Antolovich, M. *et al.*, 2002).

II.2. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne :

II.2.1. Activité antimicrobienne des extraits des plantes :

De nombreux chercheurs ont étudié l'activité antimicrobienne des extraits de plantes médicinales, ils ont constaté que ces extraits sont actifs non seulement contre les bactéries mais aussi contre les champignons, les levures et les virus. D'autres groupes de chercheurs ont franchi une étape plus loin, ils ont isolé et identifié les métabolites responsables de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes. Cette étape constitue une plateforme pour plusieurs implications incluant l'industrie pharmaceutique, la médecine alternative et la thérapie naturelle (Ghedadba, N., 2018).

Différentes approches de la découverte de médicaments utilisant des plantes peuvent être distinguées : sélection aléatoire suivie d'un criblage chimique ; sélection aléatoire suivie d'un ou plusieurs tests biologiques ; rapports d'activité biologique et usage ethnomédical des plantes. L'objectif est l'isolement ciblé de nouveaux phytoconstitués bioactifs. Lorsqu'un extrait actif a été identifié, la première tâche à entreprendre est l'identification des phytoconstitués bioactifs, et cela peut signifier soit une identification complète d'un phytoconstitué bioactif après purification, soit une identification partielle au niveau d'une famille de constitués connus (Ahmad, I., Aqil, F., & Owais, M. (Eds.), 2006).

II.2.2. La méthode de diffusion sur disque :

Un disque de papier filtre, une coupe poreuse ou un cylindre sans fond contenant des quantités mesurées de médicament est placé sur un milieu solide qu'on a largementensemencé d'organismes de test. Après incubation, le diamètre de la zone d'inhibition claire entourant le dépôt de médicament sert à mesurer la puissance d'inhibition du médicament contre l'organisme de test particulier. Evidemment cette méthode dépend de nombreux facteurs chimiques et physiques qui s'ajoutent à la simple interaction du médicament et des organismes (par exemple : nature du milieu) (**Jawetz, E. et al., 1973**).

II.2.3. Méthode de la croissance radiale sur milieu solide :

La fermentation solide (fermentation de substrats solides, fermentation humide, culture solide, etc. et en anglais : solid-state fermentation ou SSF) est un procédé technologique qui reproduit les conditions de vie naturelle des microorganismes, en particulier celles des champignons filamenteux et des champignons supérieurs, en permettant leur développement (adhésion) à la surface d'un support organique (**Hölker, U., & Lenz, J., 2005**).

La fermentation en milieu solide est définie comme une fermentation impliquant des particules solides humides en absence ou presque d'eau libre. La FMS est donc constituée de trois phases : une matrice (phase solide), une phase liquide absorbée ou complexée dans la matrice solide et une phase gazeuse prise au piège dans les particules ou entre celles-ci. Le développement des champignons filamenteux en FMS se fait par extension et ramification des filaments formant le mycélium (**Prevot, V., 2013**).



CHAPITRE 02

Présentation des plantes étudiées

Ce chapitre a été dédié à la l'étude bibliographique des deux plantes *Thapsia garganica* L. et *Prunus persica* L., généralités sur la famille botanique ou elles appartiennent, la description botanique, ainsi que l'utilisation médicinale traditionnelle et thérapeutique.

I. *Thapsia garganica* L. :

I.1. Généralités sur les apiacées :

Les Apiaceae anciennement appelées Umbellifères, étaient déjà connues des anciennes civilisations chinoise et indienne du Mexique, ainsi que des Grecs et des Romains. Elles semblent être la première famille de plantes à fleurs reconnue en tant que telle par les botanistes vers la fin du XVIe siècle (**Lamamra, M., 2018**).

Il s'agit d'une famille très homogène, une des plus faciles à reconnaître, grâce à ses inflorescences en ombelles généralement composées, inversement les espèces sont parfois difficile à distinguer les unes des autres (**Filliat, P., 2012**).

La famille des Apiacées est connue pour inclure des espèces de grande valeur nutritionnelle et pharmacologique, telles que *Daucus carota* L. (carotte) et *Thapsia garganica* L. (carotte mortelle).

I.2. Définition de genre *Thapsia garganica* :

Thapsia garganica est une plante médicinale antique qui contient des thapsigargins comme constituants actifs. Thapsigargins sont fortement les lactones oxygénées de sesquiterpène avec trois ou quatre groupes d'ester une stéréochimie spécifique, avec un anneau cis-annulé de lactone et des activités biologiques uniques de possession. Les sesquiterpènes représentent plus de 1000 composés naturels, dont certains ont des activités biologiques très importantes comme la Thapsigargine (anticancéreux spécifique des tumeurs de la prostate).

Cependant, les activités biologiques n'ont pas été identifiées jusqu' à l'isolement du thapsigargin **I** et du thapsigargin **II** de *T. garganica* (**Rasmussen, U., 1978 ; Broegger Christensen et al., 1982**), une herbe éternelle accroissante sur les champs pierreux et arénacés, et le long des bords de la route dans le secteur méditerranéen. La résine des racines de *T. garganica* a été connue puisque des temps antiques de causer une dermatite vigoureuse de contact et a été passée dans la médecine folklorique jusque récemment, particulièrement par les Arabes de l'Afrique nordique.

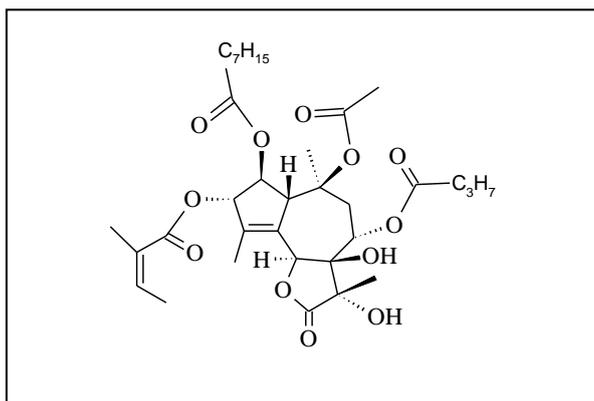


Figure 09 : Structure de Thapsigargin (Jäger, A. K. et al.,1993).

I.3. Description de la plante :

Le *Thapsia* est une plante vivace herbacée assez robuste de 40 à 100 cm de hauteur. Les feuilles de base sont en rosette appliquée sur le sol : elles sont très divisées en lobes assez étroits, vert sombre dessus et cendrées dessous. Le reste de la plante est glabre, sans feuilles ni bractées (les feuilles caulinaires sont réduites à une gaine jaunâtre à sommet pointu), à tige finement striée. Le fruit de grande taille 25mm sur 15mm est un akène double dont les deux méricarpes ont les cotes secondaires, latérales, fortement dilatées en ailes membraneuses. Toute la plante renferme une résine rubéfiante, localisé dans les nombreux canaux. La fleuraison de cette plante se fait en moi de mai (Rachid Meddour, 2012).



Figure 10 : Photographies de la partie aérienne et sous terrain de la plante *Thapsia garganica* (photos réelles).

I.4. Classification systématique :

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

Le tableau 02 regroupe la classification systématique de la plante *Thapsia garganica*.

Tableau 03 : Classification du *Thapsia garganica*.

Rang	Nom scientifique
Règne	Plantae
Classe	Magnoliopsida
Famille	Apiaceae
Genre	<i>Thapsia</i>
Espèce	<i>Thapsia garganica</i>
Sous-espèce	<i>Thapsia garganica</i> subsp. <i>Garganica</i>

I.5. Synonymes

- *Thapsia decussata* Lag.
- *Thapsia lineariloba* Pomel.
- *Thapsia marocana* Pomel.
- *Thapsia silphia* ST-Lag
- *Thapsia stenocarpa* Pomel.

I.6. Noms usuels

Thapsia garganica a plusieurs appellations vulgaires selon les différentes régions.

- Nom scientifique : *Thapsia garganica* L.
- Nom arabe: Deeriass, bou-Nefa.
- Nom français : Turbith bâtard, thapsia vrai.
- Nom Anglais: Deadly carrot, smooth thapsia.
- Noms vernaculaires en arabe dialectal : Denas, drias, « derias. Au Maroc, la plante s'appelle également aderyas, touffalte, rouaba, rapat chkaoui, abagur, abu ou seffarate lmayz. La racine est appelée «bou nâfa »soit "père de la santé", ce qui selon Battandier (1900) prouve l'estime que porte la population à cette plante (Battandier JA., 1900).

I.7. Écologie, répartition :

Locale: *Thapsia garganica* L. pousse spontanément en Algérie (Soubeiran E et Regwuld J., 1988).

Régional: Dans la région de l'Achach, au Maroc dans la région de l'Achach, au Maroc, elle apprécie les clairières forestières, les pâturages sablonneux et rocaillieux, les steppes, dans la plaine et les basses montagnes (Bammi, J., & Douira, A., 2004).

Global: Espagne, dans les îles Baléares, en Italie, en Sicile, en Sardaigne, dans plusieurs îles Grecques, et dans plusieurs îles de l'Archipel, à Constantinople et dans l'Asie occidentale (Soubeiran E et Regwuld J., 1988).

Thapsia garganica se pousse au Maroc, Algérie, Tunisie et en Lybie mais aussi en Turquie, Espagne, Portugal, Italie et en Grèce (Hand, R., 2011 ; Bammi, J., & Douira, A., 2004).

I.8. Utilisations populaires :

L'utilisation médicinale traditionnelle de *Thapsia garganica* se concentre sur L'écorce de racine, par digestion dans l'alcool, fournit une résine utilisée surtout comme révulsive, antirhumatisme et plus rarement comme purgatif drastique. La plante entière est utilisée comme cataplasme contre les fluxions, les abcès, etc (Perrot, É., 1971).

✓ Usages alimentaires :

Rachid Meddour (2012) rapporte divers usages alimentaires en Kabylie : Ait Ouabane et Ait Alloua, le couscous cuit à la vapeur du bulbe (mis à ébullition) est consommé (le couscous seul) pour ses vertus digestives et tonifiantes. À Ait Ouaghli, les bulbes servent à préparer un mets typique pour la célébration du 1er jour du printemps berbère : le couscous au thapsia ("seksou udheryis").

✓ Usages agricoles

Les Arabes employaient comme topique sur certaines affections articulaires des chevaux un onguent composé de racine et de goudron (Soubeiran E. 1870).

Rachid Meddour (2012) ajoute d'autres emplois : En usage externe, le bulbe trempé dans de l'huile d'olive sert à masser les mamelles des animaux pour son effet galactogène. *Le Thapsia* a également la propriété de "gonfler" la peau, ainsi les vendeurs de bétail malhonnêtes frottent leurs bêtes avant de les vendre au marché bien "grosses"! Les feuilles et les racines broyées et jetées dans les eaux des oueds, servent à pêcher facilement les poissons ("assommés"), lesquels sont consommés sans risque aucun d'intoxication.

Un usage agronomique notoire est celui de déposer des feuilles de *Thapsia* sur les arbres fruitiers et les vignes au moment de la floraison, elles évitent ainsi l'avortement des fleurs et la chute précoce des fruits. Comme le contact direct des feuilles vertes provoque une dermatite, les paysans se protègent les mains avec de l'huile d'olive.

✓ Usages médicaux :

En Algérie, traditionnellement, le bou-néfa, après exsudation d'un suc visqueux obtenue sur des charbons ardents, était frictionné sur la peau en guise de révulsif (**Reboulleau SD., 1856**).

Rachid Meddour rapporte divers emplois médicaux kabyles : « les feuilles fraîches, chauffées et trempées dans de l'huile d'olive, étaient appliquées en cataplasme afin de calmer les douleurs articulaires. Cet usage se retrouvait également à Majorque (**Marès, P., & Vigineix, G., 1880**). Par voie interne, la consommation de la viande cuite en friture, sur quelques tranches de racines de *Thapsia* (préalablement bouillies dans l'eau), est fortement indiquée dans le traitement des infections utérines chez les femmes ! A *Ait Ouaghli* (Bejaia), les racines broyées sont chauffées à petit feu pendant des heures dans de l'huile d'olive, le liquide qui en résulte est utilisé pour traiter la stérilité féminine (**Rachid Meddour**).

Les racines de *Thapsia garganica* L. sont utilisées en médecine traditionnelle algérienne pour de nombreuses affections. Il est utilisé en cataplasme comme traitement antitussif de la bronchite aiguë et de la pneumonie, dans des préparations à base de lait ou d'huile à prendre par voie orale pour traiter les maladies pulmonaires courantes, et avec l'application directe de sections de racines pour apaiser les douleurs dentaires (**Ibrahim, A. M. M. et al., 2018**).

Au Maroc, la réputation de l'efficacité de la plante dans le traitement de la stérilité féminine est si grande qu'un proverbe marocain dit "li ma weldet î ala deryas, ghir taqtâ liyas", ce qui veut dire "celle qui n'a pas réussi à enfanter au moyen de *Thapsia*, doit perdre l'espoir d'accoucher un jour" (**Bellakhdar, J., 1997**).

✓ Utilisations pharmacologiques :

Ayant observé l'usage révulsif du bou-néfa, le Docteur **Reboulleau SD. (1856)** a l'idée de l'améliorer sous la forme d'un emplâtre à base de résine, prescrit contre la bronchite aiguë (**Bouchut, E., 1883**). Le succès est tel que **Battandier JA (1900)** précise que la racine est exportée en grande quantité et que la résine a été extraite quantitativement. Mais il explique également que cette industrie a alors « à peu près cessé ». Six ans après, Tribut confirme l'arrêt de la production industrielle de résine en Algérie.

I.9. Cytotoxicité :

Liu, H. et al. (2006) ont mené une étude sur la cytotoxicité de la thapsigargine et des esters des phénylpropanoïdes isolés à partir des fleurs de *Thapsia garganica*. Les tests ont été effectués sur des lignées cellulaires cancéreuses de la leucémie, du carcinome et du sein. Les IC50 ont révélé que la thapsigargine possède un potentiel cytotoxique plus élevé par rapport aux esters phénylpropanoïdes.

I.10. Toxicité :

Le contact avec cette plante provoque des éruptions sur le corps, accompagnées de fièvre (**Perrot, É., 1971**). Différentes parties ont été utilisées pour l'étude de la toxicité de cette plante chez les souris de laboratoire à savoir les feuilles, les fleurs et la racine. Une infusion a été préparée, à partir de différentes parties de *Thapsia garganica*. Quelques heures après l'ingestion de celle-ci par les souris certains paramètres sanguins ont été estimés, à savoir des enzymes hépatiques telles que : les transaminases glutamique oxaloacétiques (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 47.6UI 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, F. E., & Berri, Y., 2011**).

La plante est également toxique pour les chameaux « car elle contient dans sa partie aérienne un suc rouge et corrosif qui brûle l'estomac de l'animal et le tue » (**Cauvet in Le Floc'h, 1983**). Les éleveurs musèlent pour cela leurs bêtes quand la plante est en fleur.

I.11. Composition chimique :

- **Composés terpéniques** : lactones sesquiterpéniques(thapsigargines , thapsigargicines) (**Avato, P. et al., 2001**).
- **Les huiles essentielles** : L'huile essentielle extraite des racines contient principalement de l'élimicine (54 à 73 %) et de la latifolone (20–32%) (**Avato, P. et al., 2001**).
- **Flavonoïdes** : Les parties aériennes de *Thapsia garganica* L. sont riches en flavonoïdes tels que les flavones et les flavonoles (**Harborne, J. B., & Williams, C. A. (1972).** ; **Stocker, P., et al., 2004** ; **Djeridane, A., et al., 2006**).
- **Coumarines** : Les racines de *Thapsia garganica* L. contient des composés appelés les coumarines (**Larsen, P. K., et al., 1970**). Ils se trouvent libres ou sous forme hétérosides

dans beaucoup de famille dicotylédones, surtout chez les Apiacées. Ces molécules sont très complexes (Bruneton J., 1999 ; Ojala, T., *et al.*, 2000).

➤ **Les alcaloïdes** : des alcaloïdes pipéridiniques (grande ciguë) (Bruneton J., 2005).

Les analyses chimiques et pharmacologiques ont prouvé que les composés bioactives principaux synthétisés par l'usine sont les deux polyoxygénés des guaianolides appelés *thapsigargin* et *thapsigarginin*. En particulier, elles ont été identifiées en tant que libérateurs non-cytotoxiques puissants d'histamine, stimulants de différentes cellules du système immunitaire (Christensen, S. B. *et al.*, 1993), instigateurs de tumeur de non-TPA (Hakii, H., *et al.*, 1986; Watanabe, M. *et al.*, 1995) et inhibiteurs sélectifs de SERCA-ATPases chez les cellules animales (Janczewski, A. M., & Lakatta, E. G., 1993; Inesi, G., & Sagara, Y., 1992).

Le genre *Thapsia* produit une variété de sesquiterpénoïdes, dont des lactones sesquiterpéniques. Le sesquiterpène le plus étudié du genre est le sesquiterpène lactone *thapsigargin*, qui est le sesquiterpène lactone prédominant dans *Thapsia* (Andersen, T. B., *et al.*, 2017).

La thapsigarginine est le principal constituant de la thapsia. Il est utilisé dans le traitement du cancer principalement pour le cancer du sein, le cancer du côlon et aussi le cancer du poumon (Agarwal, N. *et al.*, 2011).

II. *Prunus persica* L. :

II.1. Généralités sur les rosacées :

Les Rosacées représentent une grande famille cosmopolite de plantes à fleurs, spécialement représentée dans les régions tempérées de l'hémisphère Nord. Elle comprend aussi bien des plantes herbacées vivaces que des arbustes ou des arbres. Elle compte 100 à 115 genres et plus de 3000 espèces différentes (Heywood, V. H. *et al.*, 1993 ; Spichiger, R. E *et al.*, 2002).

En dépit de la grande diversité de ses caractères anatomiques et végétatifs, et de la morphologie variable de ses fruits, les rosacées ont été depuis longtemps considérées comme monophylétiques. La classification de cette famille selon les différentes approches phylogénétiques ou morphologiques est bien établie, contrairement à sa division en quatre sous familles bien plus controversé, et dont le critère traditionnel est le type de fruit :

- *Amygdaloideae* (famille du pêcher),
- *Maloideae* (famille du pommier),
- *Rosoideae* (famille du rosier),
- *Spiraeoideae* (famille de la spirée).

En effet, les sous-familles classiques ne sont pas confirmées par l'analyse moléculaire, les *Spiraeoideae* n'étant pas monophylétiques (Judd, W. S. *et al.* 2002).

II.2. Historique et origine :

Le pêcher (*Prunus persica*) est probablement, après le pommier et les agrumes, la troisième espèce fruitière cultivée à travers le monde. Le nom d'espèce "persica" lui a été initialement donné parce qu'on le croyait originaire de la Perse. Des recherches ont montré que toutes les formes cultivées sont originaires de la Chine septentrionale (Faust, M., & Timon, B., 1995). Ses fruits sont économiquement et nutritionnellement importantes et elles sont l'un des fruits consommés les plus populaires dans le monde (Zhao, X. *et al.*, 2015). Les Grecs les ont introduites en Europe et, comme pour beaucoup de fruits, les Romains contribuèrent à les disséminer (Scordino, M. *et al.*, 2012). En Europe du Nord, le pêcher était considéré comme un fruit XVI^e siècle grâce aux Espagnols qui l'implantent en Floride. (Lurie, S., & Crisosto, C. H., 2005 ; Leterme, E., & Lespinasse, J. M., 2008 ; Lahbari, M., 2015).).

II.3. Noms usuels :

- ❖ Nom vernaculaire : khoukh. الخوخ
- ❖ Noms communs : Pêcher.
- ❖ Noms scientifiques : *Prunus persica* (L.) Batsch. Ou *Persica vulgaris*.
- ❖ Nom binominal : *Prunus persica* (L.) Batsch.

II.4. Classification systématique :

Le tableau suivant représente la classification systématique de la plante *Prunus persica*.

Tableau 04 : Classification phylogénétique du *Prunus persica* L. (Leterme, E., & Lespinasse, J. M., 2008).

Rang	Nom scientifique
Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-Classe	Rosidae
Ordre	Rosales
Famille	Rosaceae
Sous –Famille	Amygdaloideae
Genre	<i>Prunus</i>
Espèce	<i>Prunus persica</i>

II.5. Description de la plante *Prunus persica* :

Le pêcher est un arbre fruitier rustique cultivé depuis l'antiquité. En règle générale, il est auto fertile, mais il peut aussi se multiplier par greffe. Sa hauteur est variée entre 2 et 10 m selon les variétés, son écorce est lisse au toucher. Pouvant atteindre les 15 cm les feuilles de cette arbre son caduques. Elles laissent échapper une odeur légèrement semblable à celle d'une amande. Apparaissant vers le début du printemps ou au plus tard en été pour certains variétés, les fleurs du pêcheront une couleur rose. Celle-ci comptent 5 pétales, un style de 25 étamines tout au plus .elles sont hermaphrodites (**Danie Poiret, 2011**).



Figure 11 : Photographie de l'arbre *Prunus persica* (Photo réelle).

II.6. Répartition géographique :

Prunus persica L. (Pêcheur) nommé *Amygdalus persica* est un arbre de la sous-famille Prunoideae de la famille des rosacées couramment cultivée en Asie de l'Ouest, l'Europe, l'Himalaya et l'Inde jusqu'à une altitude de 1000 pieds Il y a environ 100 genres et 3000 espèces de la famille des Rosacées (**Judd WS et al., 1999**).

II.7. Ecologie :

Le pêcher est une espèce à autogamie préférentielle, avec 5 % de fécondations allogames observées en conditions naturelles. Les autofécondations se réalisent facilement (**Doré, C., & Varoquaux, F., 2006**).

II.8. Parties utilisées :

En médecine traditionnelle, les feuilles sont les plus utilisées (**Sasikumar, J. M. et al., 2012**).

II.9. Composition et valeur nutritionnelle :

L'apport alimentaire de la pêche fraîche est lié à la présence de minéraux, de fibres alimentaires, d'eau et à son faible apport en lipides, calories et à l'absence de cholestérol (**Dalla Valle *et al.*, 2007 ; Kahlon, T. S., & Smith, G. E., 2007**).

Pour 100 g de pêche fraîche, la composition est la suivante (**Bassi, D., & Monet, R., 2008**) :

- Eau : 87,50 %
- Protéines : 0,76 %
- Lipides : 0,11 %
- Glucides : 8,89 %
- Fibres alimentaires : 1,92 %
- Acides organiques : 0,57 %
- Minéraux : 0,45 %
- Valeur énergétique : 41,30 Kcal

Les pêches fraîches sont une bonne source de vitamine A et de vitamine B3, de potassium, de phosphore, de magnésium, et une très bonne source de vitamine C. C'est surtout dans la peau que se concentrent les vitamines, les fibres alimentaires et les antioxydants, pour en tirer tous les bénéfices, vaut mieux ne pas peler les pêches (**Gasparotto, J. *et al.*, 2014**).

II.10. Composition chimiques :

La pêche est un aliment riche en fibres alimentaires (**Gorinstein, S. *et al.*, 2002**).

- ❖ Les antioxydants de la pêche :
 - ✓ Vitamine E ou l' α -tocophérol (**Favier, A., 2003 ; Pastre, J., 2005**).
 - ✓ Vitamine C ou l'acide ascorbique (**Pastre, J., 2005 ; Valko, M. *et al.*, 2006 ; Haleng, J., *et al.*, 2007 ; Hyardin, A., 2008**).
 - ✓ Caroténoïdes : Le β -carotène (provitamine A) (**Hyardin, A., 2008**), la -cryptoxanthine. Les autres carotènes présents dans les variétés de *Prunus persica* sont le lycopène, le -carotène, le ζ -carotène, le phytoène et le phytofluène. Des xanthophylles supplémentaires sont la zéaxanthine et la lutéine qui sont présentes sous forme de xanthophylles libres ou d'esters d'acides gras (**Baldermann, S., 2008**).
- ❖ Composés phénoliques de la pêche :
 - ✓ Acides phénoliques : Acide férulique, Acide p-Coumarique, Acide caféique, Acide neochlorogénique, Acide chlorogénique (**Chang, S. *et al.*, 2000 ; Gorinstein, S. *et al.*, 2002**).

- ✓ Flavonoïdes : Les flavonols identifiés dans les pêches sont : la quercétine-3-rutinoside (qu-3-rut), la quercétine-3-glucoside (qu-3-GLC), la rutine et l'isoquercétine, retrouvés principalement dans la peau (Chang, S. *et al.*, 2000 ; Tomás-Barberán, F. A. *et al.*, 2001).
- ✓ Tannins : Une étude sur les pêches a montré que le catéchine, l'epicatéchine, et le procyanidine B1 sont les principaux flavan-3-ols de la pêche (Tomás-Barberán, F. A. *et al.*, 2001).
- ✓ **Utilisations médicinales traditionnelles :**
- ✓ Les maladies diverticulaires et coronariennes. Les fibres alimentaires présentent différents effets physiologiques, la régulation du transit intestinal en empêchant ou en soulageant la constipation (Tomás-Barberán, F. A. *et al.*, 2001). Elle diminue le risque de maladies cardio-vasculaires et de cancers. La pêche participe au bon fonctionnement intestinal (Dalla Valle, A. Z. *et al.*, 2007 ; Kahlon, T. S., & Smith, G. E., 2007).

II.11. Utilisations thérapeutiques :

- Une étude *in vivo* et *in vitro* a montré que les acides phénoliques, les procyanidines et les caroténoïdes de la pêche ont un potentiel dans la chimio-prévention et la chimiothérapie du cancer du sein chez la femme (Noratto, G. *et al.*, 2009).
- Des études épidémiologiques ont montré que la consommation régulière des fruits diminuait le risque d'apparition de maladies dégénératives chroniques tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires, l'athérosclérose et l'ostéoporose (Gil, M. I. *et al.*, 2002 ; Dalla Valle, A. Z. *et al.*, 2007).
- Les feuilles de *P. persica* sont anthelminthiques, insecticides, astringents, diurétiques, expectorants, fébrifuges, laxatif, et légèrement sédatif. Ils sont utilisés en médecine interne dans le traitement de la gastrite, la coqueluche, la toux et la bronchite. En outre, la plante présente des propriétés antimicrobiennes, des effets antioxydants, anti-tumoraux et antisyndrôme d'Oketsu (Sasikumar, J. M. *et al.*, 2012).

II.12. Toxicologie :

Prunus persica est classé comme plante non toxique, mais pouvant devenir toxique sous certaines conditions d'utilisation (Zeggwagh, A. A. *et al.*, 2013).



CHAPITRE 03

Matériel et Méthodes

I. Matériel végétal, criblage phytochimique, extraction :

I.1. Critères de choix des plantes étudiées :

Pour mener à la recherche des composés bioactifs, la sélection initiale des plantes à récolter est une étape cruciale qui peut s'appuyer sur différentes approches. Celles-ci reposent le plus souvent sur le criblage aléatoire, la littérature, la chimiotaxonomie ou l'ethnopharmacologie...

I.2. Echantillonnage :

I.2.1. Récolte de deux plantes :

1. *Thapsia garganica* est une plante poussant spontanément en Algérie. La récolte de cette plante a été réalisée au niveau de la région d'Ain El Hadjer (Wilaya de Saida) au moment de floraison (Mois de novembre).
2. La récolte des feuilles du pêcher (*Prunus persica L*) a été faite au mois de juin en phase de maturation au niveau de la région de Moughrar (Wilaya de Nâama).

Les deux espèces ont été identifiées par l'Agence Nationale de la Conservation de la Nature (ANN) unité de Béchar.

Tableau 05 : Paramètres géographiques et bioclimatiques des stations d'étude.

Plantes	Stations	Période de récolte	Parties étudiées	Longitude	Latitude	Altitude (m)	Etage bioclimatique
<i>Prunus persica</i>	Moghrar (W. Nâama)	Mai - Juin	Feuilles	32°31'4" N	0°34'49" O	924	Désertique sec et froid
<i>Thapsia garganica</i>	Ain Lahdjer (W. Saida)	Novembre-Janvier	Feuilles Racines	34°45'31" N	0°8'44" E	1014	Semi-aride sec et froid

La matière végétale a été séchée à température ambiante et à l'abri de la lumière puis broyée, elle est ensuite conservée dans des récipients hermétiquement fermé en verre jusqu'à son utilisation.

II. Criblage phytochimique :

Les tests suivants ont pour but de révéler la présence ou l'absence des composés du métabolisme secondaire dans les deux plantes, ces tests sont qualitatifs réalisés selon le protocole mis au point par **Nemlin, J., & Brunel, J. F. (1995)**, sur les feuilles et les racines de *T. garganica* ainsi que les feuilles de *P. persica*, on utilisant 3 extraits : extrait étheré, méthanolique, et aqueux.

II.1. Préparation des extraits :

1. Extraits étheré :

Dissoudre 20 g de poudre obtenue dans 60 ml d'éther diéthylique. L'ensemble a été homogénéisé par agitation électrique pendant 15 min. La mixture a été ensuite filtrée sur un papier filtre. Le filtrat obtenu a été nommé filtrat étheré 1. Sur les résidus, nous avons ajouté 60 ml d'éther diéthylique ; après 15 min d'agitation puis filtration, nous avons obtenu le filtrat étheré 2. La même opération a permis d'obtenir le filtrat étheré 3. Ces 3 filtrats ont été regroupés puis concentrés à 25 ml par évaporateur rotatif. Cette série d'opérations conduit à une solution concentrée que nous avons appelée extrait étherique.

2. Extrait méthanolique :

Le marc résiduel de l'éther diéthylique, a été séché à l'air libre sur un papier filtre. La poudre obtenue a été récupérée dans 60 ml de méthanol. Après 15 min d'agitation le filtrat méthanolique 1 obtenu. La même opération a conduit au filtrat méthanolique 2. Les deux filtrats méthanoliques sont ensuite concentrés à 50 ml, pour donner l'extrait méthanolique.

3. Extrait aqueux :

Pour préparer l'extrait aqueux nous avons infusé 5 g de poudre sèche de notre matériel végétal broyé dans 50 ml d'eau distillée, pendant 15 min. l'infusé a été filtré pour produire l'extrait aqueux.

II.2. Tests phytochimiques sur l'extrait éthéré :

II.2.1. Test des alcaloïdes :

Ces tests sont fondés sur la capacité qu'ont les alcaloïdes à se combiner avec les métaux lourds ou avec l'iode (**Randerath, 1971**).

Évaporer 10 ml de l'extrait éthéré et dissout le résidu obtenu dans 1,5 ml de HCl 2%. Ensuite on a ajouté à la solution aqueuse alcaline 1 à 3 gouttes du réactif de Mayer. La formation d'un précipité blanc jaunâtre indique la présence des alcaloïdes bases.

II.2.2. Test des emodols :

Évaporer 3 ml de l'extrait éthéré. Puis nous avons ajouté 1 ml d' NH_4OH . L'apparition d'une teinte vive varie de l'orangé rouge au violet pourpre indique la présence des emodols.

II.2.3. Test des coumarines :

Evaporer 3 ml de l'extrait éthéré. Le résidu est traité avec 1 ml d'eau chaud. Diviser le volume en deux, 0,5ml est traité avec NH_4OH 10 % et l'autre sert comme témoin. L'apparition d'une fluorescence intense UV ($\lambda=265\text{nm}$ ou 365nm) indique la présence des coumarines.

II.2.4. Test des stérols ou triterpènes :

Evaporer 5 ml de l'extrait éthéré. Le résidu est dissout dans 1 ml d'anhydride acétique puis 1 ml de chloroforme. Le mélange est partagé entre deux tubes à essai. L'un servant de témoin, et dans le font du second et à l'aide d'une pipette, 1 à 2 ml H_2SO_4 concentré sont rajoutés. A la zone de contact des deux liquides, il y a formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet, la couche surnageante devenant verte ou violette révèle la présence de stérols ou triterpènes.

II.2.5. Test des terpénoïdes :

Mélanger 5 ml de l'extrait éthéré avec 2 ml de chloroforme et 3 ml de l'acide sulfurique concentré. L'apparition d'une coloration rouge-marronne à la couche d'interface indique la présence des triterpènes hétérosidique.

II.2.6. Test des quinones libres :

A 10 ml de l'extrait étudié on ajoute quelques gouttes de NaOH 0.1N. La présence des quinones libres est confirmée si la phase aqueuse vire au jaune, rouge ou violet.

II.2.7. Test des acides gras :

Évaporer 15 ml de la solution étherée, le résidu ainsi obtenu est dissout dans l'éthanol. La solution éthanolique obtenue est ensuite concentrée à sec. Le résidu est saponifié en ajoutant 10 ml de KOH 2N. Extraire le mélange avec de l'éther diéthylique. Après évaporation à sec, l'obtention d'un résidu gras indique la présence des acides gras.

II.3. Tests phytochimiques sur l'extrait méthanolique :

Cet extrait est utilisé pour tester la présence de : alcaloïdes, tanins, flavonoïdes, et d'autres composés.

II.3.1. Test des alcaloïdes sels :

Évaporer 20 ml de l'extrait méthanolique à sec, puis ajouter 5 ml d'HCl 10 % au résidu et chauffer le mélange dans un bain marie pendant 15 min. Filtrer le mélange et l'alcaliniser avec quelques gouttes d'une solution de NH_4OH 10 % jusqu'à pH 9. Extraire la solution avec l'éther d'éthylique ensuite concentrer à sec. Dissoudre le résidu dans du HCl 2 %. Le volume est réparti dans trois tubes à essai dont un servant comme témoin. Caractériser les alcaloïdes avec les réactifs de Mayer et Wagner. Dans le cas du réactif de Mayer on obtient une turbidité ou précipité blanc-jaunâtres et pour celui de Wagner turbidité ou précipité brun.

II.3.2. Test des tanins :

A 1 ml de la solution à tester ajouter 2 ml d'eau et 2 à 3 gouttes de solution de FeCl_3 à 2%. Laisser reposer quelques minutes. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleu foncé (présence des tannins galliques) ou une coloration verte (présence des tannins catéchiques).

II.3.3. Test des composés réducteurs :

A 1 ml de la solution aqueuse, nous avons ajouté 2 ml d'eau et 20 gouttes de liqueur de Fehling. Ensuite on a chauffé la solution. L'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des hydrates de carbones

I.3.4. Test des flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont extractibles par l'alcool ou par l'eau chaude ; ils sont peu solubles dans l'eau froide, pour notre part, nous avons utilisé le méthanol.

Traiter 5 ml de l'extrait méthanolique avec quelques gouttes d'HCl concentré et 0,5 g de tournures de magnésium et on a laissé agir quelques minutes. La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge ou violet se développe après 3 mn.

II.3.5. Test des hétérosides stéroliques et triterpéniques :

Evaporer 10 ml de l'extrait méthanolique. Traiter le résidu obtenu avec 0.5 ml de chloroforme et 0.5 ml d'anhydride acétique. Le mélange est partagé dans deux tubes à essai.

L'un servant de témoin, et dans le fond du second et à l'aide d'une pipette, 1 à 2 ml de H₂SO₄ concentré sont rajoutés. A la zone de contact des deux des deux liquides, il y a formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet, la couche surnageant devenant verte (présence des hétérosides stéroliques) ou violette (présence des hétérosides triterpéniques).

II.3.6. Test des anthracénosides :

25 ml de l'extrait méthanolique, ajouter 15 ml d'HCl 10 %, on a ensuite porté l'ensemble reflux pendant 30 min. Après refroidissement de la solution on a extrait le décocté avec 15 ml d'éther diéthylique trois fois afin d'obtenir deux phases, aqueuse et étherique.

Le test de la présence des Anthracénosides est basé sur la réaction de Borntrager; on a évaporé 8 ml de la phase étherique et récupéré le résidu avec 2 ml d'eau chaude, puis ajouté quelques gouttes d'NH₄OH à 10 %. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration rouge orangé.

II.3.7. Test des anthocyanosides :

Doser la phase aqueuse obtenue auparavant, avec du NaOH, s'il y a un virage de couleur pH différent, ceci indique la présence des anthocyanosides. L'apparition d'une couleur rouge pH < 3 et bleue entre 4 et 6, caractérise les anthocyanosides.

II.4. Tests phytochimique sur l'extrait aqueux :

II.4.1. Test des saponosides :

Dans une fiole à jaugeée à 250 ml, on a mis 2 g de notre plante et 100 ml d'eau distillée, on a porté le mélange à ébullition modérée pendant 30 min. Après filtration et refroidissement, on a ajusté le volume de filtrat à 100 ml avec de l'eau distillée.

A partir de cette solution mère, on a préparé 10 tubes (1,3 cm de diamètre interne) avec 1, 2, 3, ..., 10 ml, le volume final étant réajusté à 10 ml avec de l'eau distillée. Chacun de ces tubes est agité avec énergie en position horizontale pendant 15 secondes. Après un repos de 15 min en position verticale, la formation d'une mousse persistante confirme la présence des saponosides. La teneur en saponosides est évaluée : (Pas de mousse = test négatif, mousse moins de 1cm = test faiblement positif, mousse de 1-2 cm = test positif, mousse plus de 2 cm = test très positif).

II.4.2. Test d'amidon :

Dans un tube à essai on met 5 ml de l'extrait aqueux, puis on l'a traité avec le réactif d'Amidon. L'apparition d'une coloration bleue violacée indique la présence d'amidon.

II.4.3. Test des anthraquinones :

a. Anthraquinones libres

A 1 g de poudre, nous avons ajouté 10 ml de chloroforme et chauffé pendant 3 min au bain marie. Nous avons ensuite filtré à chaud et complété à 10 ml. A 1 ml de l'extrait chloroformique obtenu, nous avons ajouté 1 ml de NH_4OH (ou KOH 10 %) dilué et agité. La coloration plus ou moins rouge indique la présence d'anthraquinones libres.

b. Test des anthraquinones combinées :

b.1 Test des O-hétérosides :

A partir du résidu de la poudre épuisée par le chloroforme, nous avons préparé un hydrolysât auquel il a été ajouté 10 ml d'eau distillée et 1 ml d' HCl concentré puis maintenu le tube à essai au bain marie bouillant pendant 15 min.

5 ml de l'hydrolysât sont agités avec 5 ml de chloroforme. A la phase organique, nous avons ajouté 1 ml de NH_4OH dilué. La présence d'anthraquinones est révélée par la coloration rouge plus ou moins foncée.

b.2 Test des C-hétérosides :

Ajouter 1 ml de FeCl_3 (10%) à la phase chloroformique obtenue précédemment avec les O-hétérosides. Après ébullition au bain -marie pendant 30 min, ajouter 1 ml de NH_4OH dilué. Une coloration rouge plus ou moins intense indique la présence des C-hétérosides.

III. Préparation des extraits sélectifs :

Après la mise en évidence des différentes familles de composés chimiques dans les deux plantes étudiées, nous avons sélectionnés cinq types de métabolites secondaires pour les extraire, tel que : les flavonoïdes, les tannins, les saponosides, les alcaloïdes et les huiles essentielles, plus l'extrait méthanolique brute. Ce choix est justifié par leurs propriétés thérapeutiques notamment les pouvoirs antioxydant et antimicrobien de ces composés.

Les extraits sélectionnés ont été choisis selon leur apparence et leur présence dans les parties étudiées des deux plantes dans les résultats du criblage. Ces extraits sont mentionnés dans le tableau suivant :

Tableau 06 : Différents extraits préparés.

Partie de la plante Extrait	<i>Thapsia garganica</i>		<i>Prunus persica</i>
	Feuilles	Racines	Feuilles
Extrait méthanolique brute	*	*	*
Flavonoïdes	*	/	*
Tannins	*	*	*
Saponosides	*	*	*
Alcaloïdes	/	*	/
Huiles essentielles	*	/	/

(*) : Préparé, (/) : Non préparé.

III.1. Préparation des extraits bruts méthanoliques:

Dans un ballon, mettre 20g de drogue végétale et 60ml de méthanol 96°, puis laisser le mélange macérer pendant 30 min. Le marc subit par la suite une deuxième macération. Après combinaison des deux macéras, le volume est réduit à 70 ml à l'aide d'un évaporateur rotatif (Benhammou, N. *et al.*, 2013).

III.2. Dégraissage du matériel végétal :

Dans un appareil de soxhlet, une quantité de 40 g de la masse végétale à 200 ml d'hexane a été porté à reflux pendant six heures (le temps que le solvant absorbe toutes les graisses contenues dans la matière végétale). Une fois l'opération est terminée, le marc a été récupéré et séché à température ambiante. Cette opération a été répétée plusieurs fois afin de rassembler une quantité suffisante de matière dégraissée sur laquelle les extractions sélectives seront effectuées.

III.3. Extraction des flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont extraits du matériel végétal, feuilles séchées et broyées par macération dans un mélange éthanol-eau (50/50 : v/v). Cette opération est renouvelée trois fois toutes les 24 heures. Après évaporation à sec des macérats hydro alcooliques sous pression réduite (Rotavapeur), le résidu sec est repris dans de l'eau distillée bouillante qui solubilise quantitativement les flavonoïdes. Une décantation à froid (12 heures) est réalisée, le contenu flavonique global est fractionné en phases par divers solvants organiques spécifiques : Phase éther diéthylique, phase acétate d'éthyle, phase n- butanol.

Après évaporation à sec des phases éther, acétate et n-butanol les extraits collectés sont repris dans le méthanol (Bekkara F. *et al.*, 1998).

III.4. Extraction des tanins :

Dans un erlenmeyer de 1L, sont introduits 100 g de matériel végétale broyée et dégraissée, 250ml d'eau distillée et 160 ml d'acétone. Le mélange est porté à macération pendant 4 jours à la température ambiante avec une agitation manuelle d'un temps à d'autre. Après filtration, l'acétone est évaporée à l'aide d'un évaporateur rotatif. La phase aqueuse a été extraite avec le dichlorométhane (2 x 50ml) pour épuiser les traces des pigments, chlorophylle et des substances lipophiles. Ensuite, la phase aqueuse subit une extraction (4 x 50ml) avec l'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, puis filtrée et concentrée à sec pour donner l'extrait des tanins (Zhang S. *et al.*, 2008).

III.5. Extraction des saponosides :

Dans un ballon de 500 ml, sont introduits 20 g de matériel végétal broyé et dégraissé et 200 ml de l'éthanol à 20%. Le mélange est porté à reflux dans un bain marie à 55°C sous agitation pendant 4h. Cette opération a été répétée une deuxième fois pour le résidu obtenu après filtration. Les filtrats collectés ont été concentrés jusqu'au volume égal à 40 ml. Une série d'extraction liquide - liquide a ensuite été réalisée. La première s'effectue avec 20 ml d'éther di-éthylique.

Après évaporation de la phase étherique, une deuxième extraction liquide-liquide par le n-butanol a été entamée : 40 ml de n-butanol ont été ajoutés à la phase aqueuse obtenue après l'extraction par l'éther. Cette extraction a été répétée trois fois, ensuite la phase n-butanol a été lavée deux fois par 20 ml de solution de NaCl à 5% et concentrée jusqu'à l'obtention d'un résidu sec dont le poids exprime le rendement en saponosides (Okwu, D. E, 2005).

III.6. Extraction des alcaloïdes :

Ils ont été obtenus par triple extraction liquide – liquide selon la méthode de Harborne, A. J. (1998), la poudre a été extraite au soxhlet par 250 ml d'éthanol absolu durant cinq heures. L'extrait éthanolique a été ensuite évaporé à sec sous vide à 40 °C par un rotavapor. Le résidu sec a été repris par 150 ml de chloroforme et acidifié par l'HCl à 5 % au pH 3. La solution obtenue a été laissée reposer pendant 30 minutes à la température ambiante. La phase aqueuse acide a été extraite par 150 ml de chloroforme, basifiée par le NaHCO₃ à 5 % au pH 9 et laissée reposer pendant 15 minutes à la température ambiante. La phase chloroformique est évaporée à sec sous vide. Le résidu sec, constitué d'alcaloïdes totaux, a été pesé puis repris dans l'éthanol à 1 %.

III.7. Extraction des huiles essentielles :

L'extraction de l'huile essentielle a été réalisée par la technique d'hydrodistillation simple. Le principe de cette technique consiste à faire bouillir un mélange de 100g de la plante avec l'eau distillée (2 L). La vapeur d'eau provoque l'éclatement des cellules végétales ainsi que la libération de leur contenu en huiles essentielles. Enrichie en huiles essentielles, cette vapeur traverse un réfrigérant ou elle se condense puis le distillat (eau + huile essentielle) est récupéré dans un erlen.

Après l'extraction, le distillant récupéré est mis dans une ampoule à décanter dans laquelle on rajoute du dichlorométhane dans le but d'extraire l'huile essentielle de l'eau avec l'ajout d'une cuillère de NaCl (**Lim, S. F et al., 2017**).

Par la suite, la phase organique a été soumise à une évaporation légère à température 40°C, afin d'éliminer le dichlorométhane. L'huile essentielle est en suite prélevée à l'aide d'une pipette puis mis dans des tubes couverts par du papier aluminium et conservée à 4°C.

IV. Calcul des rendements :

Les rendements des extraits obtenus ont été calculés selon la formule suivante :

$$R_d (\%) = \frac{(P_1 - P_2)}{P_3} \times 100$$

Avec :

R_d (%) : Rendement de matière exprimé en pourcentage.

P₁ : Poids du ballon après évaporation.

P₂ : Poids du ballon avant évaporation (ballon vide).

P₃ : Poids de la poudre végétale de départ.

V. Analyses des propriétés physico-chimiques des huiles étudiées :

V.1. Indices chimiques :

V.1.1. Indice d'acide :

C'est le nombre de mg de KOH nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans 1g d'HE. Les acides libres sont neutralisés par une solution éthanolique titrée de KOH (**AFNOR, 2000**) cité par (**Nadjib, B. M., et al., 2010**).

Expérimentalement, on dissout la quantité prescrite de l'huile essentielle à examiner (m), dans 50 ml d'un mélange à volumes égaux d'alcool et d'éther. Sauf indication contraire, le solvant doit être neutralisé au préalable par l'hydroxyde de potassium 0,1 M en présence de 0,5 ml d'une solution de phénolphtaléine. Après dissolution, on titre par l'hydroxyde de

potassium 0,1 M. Le titrage est terminé lorsque la couleur rose persiste pendant 15 secondes au moins.

$$I_a = \frac{5,610 \times V}{m}$$

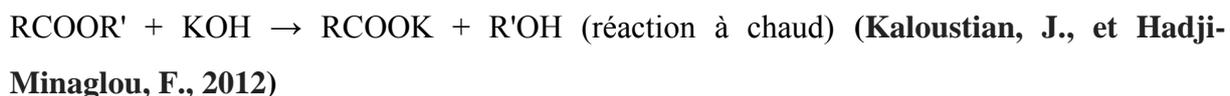
I_a : Indice d'acide.

m: La prise d'essai en **g**.

V: volume d'hydroxyde de potassium 0,1 M en **ml**.

V.1.2. Indice de saponification:

L'indice de saponification **I_s** est le nombre de mg de potasse nécessaire pour neutraliser les acides libres et saponifier les esters présents dans 1g d'huile essentielle, d'après les réactions :



Expérimentalement, on procède ainsi:

Dans un ballon de 250 ml de verre munie d'un réfrigérant à reflux, introduisez la prise d'essai (m). Ajoutez 25 ml d'hydroxyde de potassium alcoolique 0,5 M. Adapter le réfrigérant et chauffer à reflux pendant 30 min, sauf indication contraire. Ajouter 1 ml de solution de phénolphaléine et titrer immédiatement (alors que la solution est encore chaude) par l'acide chlorhydrique 0,5 M (Effectuez un essai à blanc dans les mêmes conditions). **AFNOR (2000)**.

$$I_s = \frac{28,05 (V_2 - V_1)}{m}$$

I_s : Indice de saponification.

V₁ : Volume HCl d'essai à blanc 0,5 M en **ml**.

V₂ : Volume d'acide chlorhydrique 0,5 M en **ml**.

m : Masse, en grammes , d'huile essentielle.

V.1.3. Indice d'ester:

C'est le nombre de mg de KOH nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters contenus dans 1g d'HE. L'hydrolyse des esters présents dans l'HE se fait par chauffage, dans des conditions définies, en présence d'une solution EtOH titrée de KOH (Nadjib, B. M. *et al*, 2010).

$$I_e = I_s - I_a$$

I_e : Indice d'ester.

V.1.4. Indice de peroxyde : (AFNOR, 1996).

Définition: on entend par indice de peroxyde d'un corps gras le nombre de microgrammes actif du peroxyde contenu dans un gramme de produit et oxydant l'iodure de potassium avec libération d'iode.

Principe: traitement du corps gras, en solution dans l'acide acétique et du chloroforme, par une solution d'iodure de potassium. Titrage de l'iode libéré par une solution titrée de thiosulfate de sodium.

Mode opératoire :

- Dans un flacon ou erlenmeyer on pèse 1g d'huile essentielle, ajouter 10 ml de chloroforme puis dissoudre rapidement l'huile essentielle en agitant ;
- Ajouter 15 ml d'acide acétique, puis 1 ml de solution d'iodure de potassium;
- Boucher le flacon, l'agiter pendant une minute et l'abandonner pendant cinq minutes à l'abri de la lumière ;
- Puis ajouter 75 ml d'eau distillée. Titrer, en agitant vigoureusement et en présence d'empois d'amidon comme indicateur, on titre l'iode libéré par les peroxydes avec la solution de thiosulfate de sodium (0.01 N);
- Parallèlement et simultanément effectuer un essai à blanc sans l'ajout de l'huile essentielle.

Mode de calcul et formule :

L'indice de peroxyde, exprimé en microgrammes d'oxygène actif par gramme, est égal à :

$$I_p = \left[\frac{(V - V_0) \times T}{m} \right] \times 1000$$

V: est le volume de la solution de thiosulfate de sodium utilisée pour l'essai, corrigé compte tenu de l'essai à blanc, exprimé en ml.

V₀: est le volume de la solution de thiosulfate de sodium.

T : est la normalité de thiosulfate de sodium.

m: est la masse, en gramme, d'huile essentielle.

V.2. Indices physiques : (AFNOR, 1996)

V.2.1. Pouvoir rotatoire:

Définition: C'est la propriété de certaines substances de faire tourner le plan de la polarisation de la lumière.

Principe: On a utilisé un polarimètre avec une lampe à sodium (raie jaune de longueur d'onde 589 nm) et une cellule de longueur 1 dm, remplie d'huile essentielle dans l'éthanol à raison de 0.2g dans 100 ml. L'angle de rotation est lu directement sur l'appareil (AFNOR, 1996).

Expression des résultats :

La valeur de $[\alpha]_D^{20}$ est calculée à l'aide de la relation de Boit avec :

$$[\alpha]_D^{20} = \alpha / (L \times C)$$

α : valeur lue sur l'appareil en milli degré.

L : épaisseur du film en dm.

C : concentration de l'huile essentielle exprimée en g/ml.

V.2.2. Densité relative à 20 °C:

Définition: La densité relative à 20 °C d'une huile essentielle est le rapport de la masse d'un certain volume d'huile, à la masse d'un volume égal d'eau distillée.

Principe: à l'aide d'un pycnomètre, pesé successivement de volumes égaux d'huile essentielle et d'eau à la température de 20 °C (AFNOR, 1996).

La densité est ainsi donnée par la formule:

$$D = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

m_0 : est la masse, en grammes, du pycnomètre vide

m_1 : est la masse, en grammes, du pycnomètre rempli d'eau

m_2 : est la masse, en grammes, du pycnomètre rempli d'huile essentielle.

V.2.3. Indice de réfraction:

Définition: l'indice de réfraction d'une huile essentielle est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante.

- Utiliser un réfractomètre permettant la lecture directe d'indices de réfraction situés entre 1.300 et 1.700, l'appareil est ajusté de manière à donner, à la température de 20 °C, une valeur de 1.333 pour l'eau distillée (AFNOR, 1996).

VI. Analyses spectroscopiques et chromatographiques :

VI.1. Analyses par Chromatographie sur couche mince :

Afin d'avoir une idée sur la composition chimique de nos extraits, nous avons effectué un criblage phytochimique par CCM sur des plaques en aluminium (CCM Gel de silice 60 F₂₅₄) (20x20 cm).

VI.1.1. Le choix de la phase mobile :

La phase mobile est constituée par un mélange de solvants organiques. Pour cela, différents systèmes solvants ont été essayés pour définir ceux qui donnent les meilleures séparations.

VI.2. Séparation des flavonoïdes et des tanins par Chromatographie sur Colonne (CC) :

Dans le but de trouver de nouvelles molécules naturelles, nous avons soumis les quatre extraits (éthérique, butanolique, acétate d'éthyle, et tanins) au fractionnement par chromatographie sur colonne de gel de silice. Nous avons regroupé les fractions en fonction de leurs R_f après analyse sur CCM. Les constituants d'un mélange sont caractérisés par le facteur de rétention R_f calculé par la formule :

$$R_f = \frac{\text{distance parcourue par le composé}}{\text{distance parcourue par le solvant}}$$

Le R_f dépend des constituants analysés, de l'adsorbant et du système d'élution.

Pour les chromatographies d'adsorption, la phase stationnaire utilisée est la silice en phase normale SDS 60 Å 60-200 µm (0,8 cm³/g pore volume). L'élution est réalisée par simple gravité. La quantité de silice utilisée est généralement 30 à 50 fois supérieure à la quantité d'échantillon déposée. Les fractions recueillies sont regroupées selon les résultats de l'analyse par CCM.

VI.3. Identification des extraits par Spectroscopie Infrarouge :

Cette analyse a été effectuée à l'aide d'un spectromètre IR type Agilent Technologies Cary 630 FTIR au niveau des laboratoires pédagogiques de chimie à l'UTMB.

VI.4. Analyses chromatographiques d'huile essentielle des feuilles de *Thapsia garganica* : Chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectroscopie de masse (CPG/SM) :**Protocole expérimentale :**

L'analyse par GC-MS de l'huile essentielle des feuilles de TG a été réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse de marque Shimadzu type TQ8040 NX couplé avec un spectromètre de masse (TQ8040 NX). La fragmentation est effectuée par impact électronique sous un champ de 0.86 kV. La colonne utilisée est une colonne capillaire type Rxi®- 5ms (Crossbond 5 % diphenyl / 95 % dimethyl polysiloxane) ; (30 m × 0,25 mmID, épaisseur du film : 0,25 µm df).

La détection est assurée par un détecteur thermionique de flamme (FTD / BID). Le gaz vecteur utilisé est l'hélium dont le débit est fixé à 11,7 ml/min. La température de l'injection : 260.0°C, programmation de température : 70°C durant 1 min, puis la température augmente à 150°C pendant 10 min, puis à 200°C pendant 10 min, et après la température augment jusqu'au 260°C durant 5 min, et volume injecté : 8.0 µL en mode Split. L'appareil est piloté par un système informatique gérant une bibliothèque de spectres de masse NIST 17, et W11N17MAIN1.

VI.5. Analyse des extraits séparés par résonance magnétique nucléaire (RMN¹H, RMN¹³C) :

Les fractions séparées et purifiées par chromatographie sur colonne ont été analysées par RMN¹H, RMN¹³C au niveau de laboratoire de Synthèse Organique Appliquée (LSOA) à l'Université Ahmed Ben Bella Oran.

Le spectre de résonance magnétique nucléaire (RMN) est la méthode la plus puissante pour élucider les structures des flavonoïdes. Types de solvants, tels que CDCl₃, DMSO-d₆, C₅D₅N, (CD₃)₂CO et CD₃OD, pourrait être utilisé lors de la réalisation d'expériences RMN.

Le DMSO-d₆ est le solvant facultatif parmi ceux-ci pour effectuer la RMN des flavonoïdes. Presque tous les types de flavonoïdes pourraient être bien dissous dans le DMSO-d₆, et les signaux de résonance des flavonoïdes sont rarement recouverts par des pics de solvant (environ δ 2,5). De plus, les signaux RMN des groupes hydroxyles phénoliques pourraient être affichés clairement avec le DMSO-d₆ comme solvant. L'inconvénient de ce solvant est son point d'ébullition élevé, ce qui rend la récupération de l'échantillon difficile (Feng, W., Hao, Z., & Li, M., 2017).

Le DMSO-d₆ a été utilisé comme solvant pour un certain nombre d'études approfondies des structures flavonoïdes par spectroscopie RMN. Certains des avantages de cette méthode par rapport aux autres procédures disponibles incluent ci-dessous :

- a) La plupart des flavonoïdes aglycones et glycosides sont suffisamment solubles dans le DMSO-d₆ pour une analyse RMN directe, éliminant ainsi la nécessité de préparer des dérivés.
- b) Les signaux de protons résultant de la petite quantité de DMSO partiellement deutéré toujours présente dans le DMSO-d₆ se produisent dans une bande étroite entre 2,4 et 2,6 ppm, en dehors de la région où la plupart des protons flavonoïdes absorbent.
- c) Le DMSO-d₆ (s'il est anhydre) peut être utilisé pour observer les protons sur les groupes hydroxyles phénoliques. Cependant, des traces d'eau dans le DMSO-d₆ provoquent l'élargissement des signaux de protons flavonoïdes hydroxyles (en raison d'un échange rapide de protons), rendant ainsi leur détection difficile.

Il existe cependant également un certain nombre d'inconvénients associés à l'utilisation du DMSO-d₆ comme solvant pour la spectroscopie RMN des flavonoïdes :

- a) Le DMSO-d₆ a un point d'ébullition de 189 °C, ce qui rend la récupération du flavonoïde peu pratique.
- b) Le DMSO-d₆ absorbe rapidement l'humidité atmosphérique, et le signal obtenu à partir du H₂O absorbé [variable autour de 3,5 ppm (δ)] obscurcit souvent les signaux RMN résultant de certains des protons flavonoïdes.
- c) Le DMSO-d₆ doit être manipulé avec précaution car il pénètre rapidement dans les tissus cutanés en emportant avec lui toutes les substances dissoutes (**Mabry, T. J., Markham, K. R., & Thomas, M. B., 1970**).

RMN monodimensionnelle

RMN du ¹³C : la RMN du ¹³C permet de déterminer le nombre total de carbones et d'attribuer certains signaux caractéristiques d'après les déplacements chimiques.

RMN du ¹H : la RMN du ¹H, apporte des informations d'une part, par les déplacements chimiques et d'autre part, par la multiplicité des signaux et les valeurs des constantes de couplage (**Foutse, Y., 2017**).

Dans notre étude, les spectres ont été enregistrés sur un Spectromètre Bruker BioSpin (1H, 300 MHz, 13C, 75 MHz). Les échantillons ont été solubilisés dans le solvant deutéré DMSO-d₆. Les déplacements chimiques δ , exprimés en parties par million (ppm), ont été mesurés par rapport au signal du solvant pris comme référence et rapportés au signal du DMSO-d₆. Les constantes de couplage « J » sont exprimées en Hertz (Hz) ; pour décrire la multiplicité des signaux, les abréviations suivantes ont été utilisées : **s** singulet, **d** doublet, **t** triplet, **m** multiplet. La température d'acquisition des spectres est, sauf indication contraire, la température ambiante.

En raison des faibles quantités des fractions séparées, et des problèmes de solubilité rencontrés au cours des analyses RMN, les spectres du proton et du carbone réalisées ne sont pas certainement riches en données qui peuvent être interprétables (Voir annexe 09). Et c'est pour cette raison, seul la fraction PPAE4 sera étudiée par la suite.

VII. Détermination de la teneur en polyphénols :

VII.1. Dosage des composés phénoliques totaux :

La concentration des phénols totaux dans des extraits secs des deux plantes étudiées a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu (**Waterman & Mole, 1994**, cité par **Daas Amiour, S., 2009**).

❖ Principe :

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W₈O₂₃) et de molybdène (Mo₈O₂₃) (**Ribéreau-Gayon, P. (1974)**, cité par (**Benamara, S. et al., 2008**)).

Cette coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle aux taux de composés phénoliques présents dans le milieu donne un maximum d'absorption à 760 nm.

❖ Réactifs et extraits utilisés :

- Un polyphénol témoins : l'acide gallique pour la réalisation de la gamme d'étalonnage en milieu aqueux.
- Réactif de Folin-Ciocalteu : à 10 ml du réactif Folin-Ciocalteu on a ajouté 90 ml d'eau distillée.
- Bicarbonate de sodium à 7.5 % : 15g de bicarbonate de sodium ont été dissous dans 200 ml d'eau distillée.

- Les extraits organiques ont été dissous dans le méthanol absolu alors que l'extrait aqueux a été dissous dans de l'eau distillée.

❖ Mode opératoire :

a- Préparation de la gamme d'étalonnage de l'acide gallique :

Une gamme de 9 concentrations d'acide gallique allant de 0 à 0.17 mg /ml a été préparée à partir d'une solution mère de 0.2 mg/ml de concentration.

Les concentrations d'acide gallique préparées sont : 0.01 ; 0.02 ; 0.05 ; 0.08 ; 0.1 ; 0.13 ; 0.15 et 0.17 mg / ml.

b- Analyse du standard et des extraits :

- Introduction de 300 µl de la solution de l'acide gallique à différentes concentrations dans les tubes à essai et 300 µl de chaque échantillon à analyser;
- Ajout de 1500 µl du réactif Folin-Ciocalteu puis de 1200 µl de la solution de bicarbonate de sodium dans chaque tube ;
- Agitation puis incubation à l'obscurité pendant 1 heure ;
- Lecture des absorbances à 760 nm.

Le blanc est représenté donc par 300 µl d'eau distillée, additionnée de 1.5 ml du réactif de Folin-Ciocalteu et 1.2 ml de carbonate de sodium à 7.5 %. Pour les extraits dissout dans le méthanol, l'eau distillée est remplacé par du méthanol.

c- Expression des résultats :

La concentration en composés phénoliques extractibles totaux est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

VII.2. Dosage des flavonoïdes totaux :

La méthode utilisée pour l'estimation des taux de flavonoïdes dans les deux plantes étudiées est celle décrite par (Lamaison, J. L. *et al.*, 1991) et cité par (Daas Amiour, S., 2009).

❖ Principe :

La coloration jaunâtre donnée dans cette méthode est due à la formation d'un complexe entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présent sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes (Lagnika, L., 2005).

❖ Réactifs et extraits utilisés :

- 2g de Chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) dissous dans 100 ml de méthanol absolu.
- Solution mère du standard : 0.4 mg de catéchine dissous dans 100 ml de méthanol absolu.

- Les extraits organiques dissous dans du méthanol absolu, l'extrait aqueux a été dissous dans de l'eau distillée.

❖ Mode opératoire :

a-Préparation de la gamme d'étalonnage :

Une gamme de 9 concentrations de catéchine allant de 2.5 à 40 µg /ml a été préparée à partir d'une solution mère de 40 µg /ml de concentration (400 µg de catéchine dissous dans 10 ml de méthanol).

Les concentrations de catéchine préparées sont : 2.5 ; 5.0 ; 10 ; 15 ; 20 ; 25 ; 30 ; 35 et 40µg/ml.

b- Analyse du standard :

- Des aliquotes de 0.2 à 3.0 ml de la solution mère de catéchine ont été introduites dans une série de tubes à essai, le volume finale dans chaque tube a été complété à 3 ml par addition de méthanol absolu ;
- 1 ml a été prélevé de chaque tube et transféré à un autre. ;
- 1 ml de la solution méthanolique du chlorure d'aluminium à 2 % y a été ajouté
- Après 10 mn, l'absorbance est lue à 430 nm.

c- Expression des résultats :

La concentration en flavonoïdes est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la catéchine comme standard.

VII.3. Dosage des tanins condensés :

Les tanins condensés sont dosés par la méthode de Butanol-HCl (**Porter, L. J., 1985**).

Réactifs et extraits utilisés :

- Standard : solution mère de catéchine à 0.3 mg /ml.
- Mélange Butanol -HCl (95 / 5).
- Solution ferrique sulfate d'ammonium à 2% dilué dans HCl à 2N.

La température des préparations doit être portée à 30°C.

❖ Mode opératoire :

a- Préparation de la gamme d'étalonnage de la catéchine :

Une gamme de 6 concentrations de catéchine allant de 0 à 0.3 mg /ml a été préparée à partir de la solution mère.

Les concentrations de catéchine préparées sont : 0.06 ; 0.16 ; 0.18 ; 0.24 et 0.30 mg / ml.

b- Analyse des extraits :

- 0,5 ml d'extrait ;
- 3 ml de butanol-HCl;
- 0,1 ml d'une solution ferrique ;
- Les échantillons sont incubés dans un bain marie bouillant pendant 60 min.
- L'absorbance est mesurée à 550 nm.

c- Expression des résultats :

Les valeurs obtenues sont utilisées pour déduire à partir de la courbe d'étalonnage les concentrations en tanins condensés.

VIII. Evaluation de l'activité antioxydante :

Dans notre étude, la mise en évidence de l'activité antioxydante *in vitro* de nos extraits a été réalisée par deux techniques à savoir : le piégeage du radical libre DPPH, et la réduction du fer (méthode de FRAP).

VIII.1. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil) :

VIII.1.1. Test qualitative CCM :

Dans le but de confirmer le pouvoir antioxydant des différents extraits des deux plantes, nous avons effectué un test antioxydant sur des plaques CCM. La pulvérisation de ces dernières par une solution méthanolique de DPPH• (0.004%) donne des indications intéressantes sur les constituants qui sont capables de réduire le radical DPPH•. Après un séchage de 30 min des plaques CCM à 60°C, un test positif est révélé par l'apparition des taches jaunes avec différentes intensités sur un fond violet en comparaison avec l'acide ascorbique. (Jothy, S. L., et al, 2011).

VIII.1.2. Test antioxydant au DPPH (quantification spectrophotométrique) :

VIII.1.2.1. Préparation de la solution DPPH dans le méthanol :

1 mg de DPPH est dissout dans 25ml de méthanol (solution stock). Le mélange est conservé dans un réfrigérateur à 4°C à l'obscurité. La solution peut être utilisée dans un intervalle de 1 à 4 jours.

VIII.1.2.2. Préparation de la solution mère :

Pour préparer la solution mère, dissoudre 2 mg de chaque extrait de deux plantes dans 2ml de méthanol.

VIII.1.2.3. Préparation des concentrations de l'extrait brute :

A partir de la solution mère, différentes concentrations de l'extrait brut de poudre de la plante ont été préparés : 0,625 ; 0,3125 ; 0,156 ; 0,078 ; 0,039 ; 0,0195 mg/ml.

VIII.1.2.4. Test antioxydant :

1,9 ml de la solution de DPPH ont été ajoutés à 100 µl de chaque concentration de la solution de l'extrait dissout dans le méthanol. Après agitation par un vortex les flacons sont placés à l'obscurité à la température ambiante pendant 30 minutes. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm par un spectrophotomètre UV-Visible., en utilisant le méthanol comme blanc. Les résultats ont été exprimés par la moyenne de trois mesures.

Remarques :

- Pour réaliser ces mesures on utilise un contrôle positif qui est représenté par un antioxydant de référence (l'acide ascorbique).
- On mesure l'absorbance des différentes concentrations de la solution de DPPH. (Contrôle négatif)
- Le blanc de la réaction est du méthanol pur.
- L'activité anti radicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous :

$$\text{Activité antioxydante (\%)} = \left[\frac{\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}}{\text{Abs contrôle}} \right] \times 100$$

L'activité d'un antioxydant peut être caractérisée par une grandeur appelée CI_{50} concentration équivalente à 50% de DPPH perdu est défini comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH (couleur). La CI_{50} permet de comparer l'activité de différents composés antioxydants. Plus la CI_{50} est petite, plus l'antioxydant a une activité plus importante.

VIII.2. Suivi cinétique de l'activité anti-radicalaire par le test au DPPH• :

L'activité antioxydante *in vitro* a été évaluée par la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl) selon la méthode décrite par (Burits, M., & Bucar, F., 2000) où la solution de différents extraits testés aux concentrations : 0,625 ; 0,3125 ; 0,156 ; 0,078 ; 0,039 ; 0,0195 mg/ml sont mélangées avec 75µl d'une solution méthanolique de DPPH (1,3mg/ml). Après une période d'incubation de 30 minutes à la température ambiante, l'absorbance est mesuré à la longueur d'onde de 517 nm. L'inhibition du radical libre DPPH par l'acide ascorbique (vitamine C) a été également analysée aux mêmes concentrations pour faire la comparaison.

On a déterminé les paramètres de calcul de l'activité antioxydante pour l'acide ascorbique et pour les extraits (Pourcentage d'inhibition, l'index CI_{50}). Tous les essais ont été effectués trois fois afin de vérifier la reproductibilité.

Les résultats peuvent être aussi exprimés en puissance antiradicalaire (**Brand-Williams, W. et al., 1995**).

$$ARP = 1/CI_{50}$$

ARP : Puissance anti radicalaire.

Pour mieux caractériser le pouvoir antiradicalaire des paramètres cinétiques sont introduits, tels que le temps TCE50 nécessaire pour atteindre l'équilibre à CE50, la constante de vitesse de la réaction ou le coefficient directeur de la courbe cinétique. L'estimation de TCE50 permet d'introduire la classification suivante :

- TCE50 < 5 min (réaction rapide) ;
- 5 > TCE50 < 30 (réaction intermédiaire) ;
- TCE50 > 30 min (réaction lente).

L'indice de l'efficacité antiradicalaire ($EAR = 1/ (CE50 \times TCE50)$) relie la concentration du DPPH^{*} et le temps TCE50 dans l'essai avec la concentration effective CE50 de l'échantillon, et résulte dans un paramètre constant pour chaque solution ou extrait (**Popovici, C. et al., 2010**).

VIII.2.1. Courbe d'étalonnage de la solution de DPPH^{*} :

Avant de commencer les tests de l'activité antioxydante, la stabilité et l'intervalle de linéarité des solutions de DPPH^{*} doit être évalués et les résultats sont présentés graphiquement. Six solutions du DPPH^{*} (0,5 mg/ml ; 0,25 mg/ml ; 0,125 mg/ml ; 0,0625 mg/ml ; 0,03125 mg/ml et 0,0156 mg/ml) à base du méthanol ont été testées (figure 12).

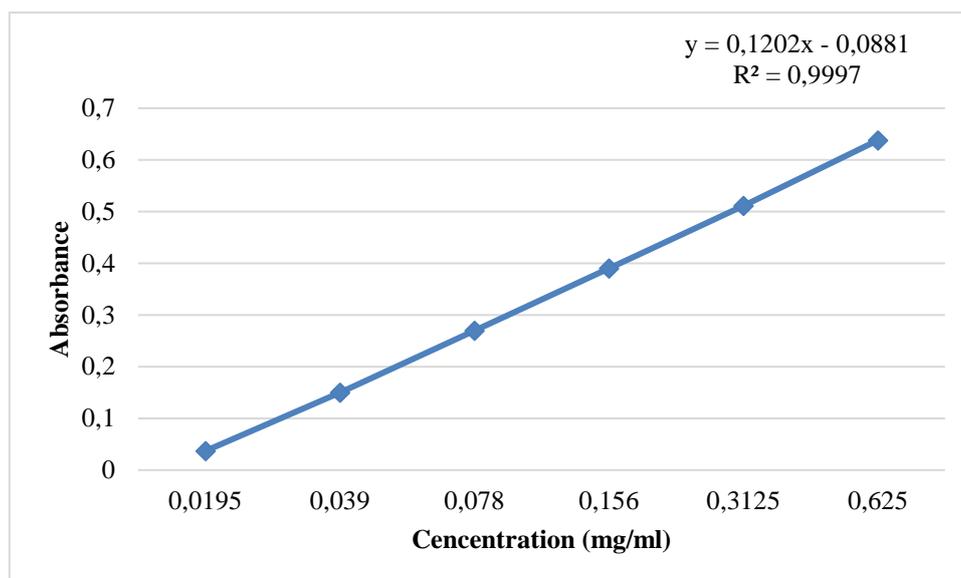


Figure 12 : Courbe d'étalonnage de solution DPPH.

VIII.2.2. Suivi cinétique :

Mélanger 2 ml de chaque solution avec 2 ml de solution de DPPH (0.004 %). Mesurer la variation de l'absorbance chaque 30 sec. L'opération est achevée quand l'absorbance devient constante.

VIII.3. Méthode de FRAP (réduction de fer) :

Cette méthode est déterminée en utilisant la technique d'Oyaizu (1986). Les différentes concentrations des extraits (1 ; 2 ; 3 ; 4 et 5 mg/ml) dans l'eau distillée (1 ml) sont mélangées avec 2.5 ml de la solution tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) et 2.5 ml de ferricyanure de potassium [$K_3Fe(CN)_6$] (1%). Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 20min. Après, 2.5 ml de l'acide trichloracétique (10%) est additionné. Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10 min. A la fin, 2.5 ml du surnageant de chaque concentration est mélangé avec 2.5 ml de l'eau distillée et 0.5 ml de $FeCl_3(6H_2O)$ (0.1%). L'absorbance est mesurée à 700 nm.

L'augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel indique l'augmentation de la réduction de fer. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif. La concentration CI50 qui est définie comme la concentration des antioxydants nécessaire pour réduire 50% de la concentration initiale du thiocyanate ferrique est un indice utilisé pour comparer et exprimer la puissance des capacités réductrices des substances bioactives.

IX. Evaluation de l'activité antimicrobienne :

IX.1. Activité antibactérienne (Méthode de diffusion sur disque) :

L'activité antibactérienne a été évaluée en observant le pouvoir inhibiteur des extraits à différentes concentrations sur les bactéries testées. Nous avons utilisé la méthode de diffusion en disque.

Cette méthode consiste à substituer les disques d'antibiotiques par d'autres disques confines à partir du papier filtre imprégnés de l'extrait dont les concentrations utilisées sont les suivantes : 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 mg/ml, pour chaque extrait, Inocule une boîte de Pétri contenant un disque imprégné par le méthanol sert comme un témoin. Les boîtes de Pétri sont ensuite fermées et laissées diffuser à température ambiante, et incubées à 37C° pendant 24 heures (Sacchetti, G. *et al*, 2005 ; Celiktas, O. Y. *et al.*, 2007).

Elle consiste de mesurer le diamètre de la zone d'inhibition de la croissance bactérienne autour d'une source d'antibiotique déposée à la surface de la gélose.

IX.1.1. Provenance de souches étudiées :

Les souches utilisées sont des souches pathogènes et contaminants fréquents, elles causent des maladies et des infections graves.

Tableau 07 : Provenance des souches bactériennes testées.

Souches bactériennes	Code	Source
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Laboratoire de microbiologie- UTMB
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Laboratoire de microbiologie- UTMB
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Laboratoire de microbiologie- UTMB
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 13311	LAPRONA- UABT
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	LAPRONA- UABT
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603	Laboratoire de microbiologie- UTMB
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778	LAPRONA- UABT
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090	LAPRONA- UABT

IX.1.2. Vérification de la purification des bactéries et identification des souches:

Nous avons procédé à la vérification des bactéries en étudiant leurs caractères morphologique (aspect des colonies, mobilité, coloration de Gram), et biochimiques (recherche de catalase et d'oxydase).

IX.1.3. Préparation de l'inoculum :

Les colonies qui ont été isolées à partir des cultures jeunes sur milieu gélose nutritive (GN) incubées à 37°C pendant 18 heures ont été transférées dans des tubes contenant de l'eau physiologie stérile (0,9% NaCl) afin de préparer des suspensions bactériennes ayant une turbidité équivalente de 0,5 Mac Ferland (10^6 à 10^7 ufc/ml) à l'aide d'un spectrophotomètre. Ensuite la suspension bactérienne préalablement préparée a étéensemencée sur la totalité de surface d'un milieu gélose Mueller-Hinton par des tapis bien serrées.

IX.1.4. Préparation des dilutions :

- Pour les différents extraits : Les concentrations préparées dans le méthanol ont été comme suit : 0.063, 0.125, 0.25, 0.5 mg/ml, pour chaque extrait.
- Pour les huiles essentielles : du fait de la non-miscibilité des huiles essentielles dans l'eau, des différentes dilutions ont été réalisés à l'aide d'éluant DMSO (**Oussou, K. R.,2004**), dans des tubes à essai contenant chacun 0.5 ml de DMSO. Quatre concentrations ont été préparées : 1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml et 0.125 mg/ml.

IX.1.5. Ensemencement:

Les boîtes de pétri contenant le milieu gélosé (Muller Hinton) sont inoculées par étalement des suspensions sur la surface de milieu à l'aide d'une anse de platine.

A l'aide d'une pince stérile, les disques (6 mm de diamètre) imprégnés dans chaque concentration (environ 10µl) sont déposés aseptiquement sur la gélose inoculée en appuyant légèrement. Les boîtes sont ensuite incubées 18h à 24 heures à 37 °C.

Après incubation, les zones d'inhibition ont été mesurés au moyenne d'une règle avec une incertitude de 0,1 mm, on l'appliquant presque au contact de la surface de la gélose.

L'activité antibactérienne a été calculée en une moyenne de trois répétitions pour chaque concentration.

IX.1.6. Préparation de témoins :

Des boîtes dites témoins ont été préparées pour la vérification de contamination. Les différents témoins sont :

- Une boîte de Pétri contenant le milieu gélosé (MH) seul.
- Une boîte de Pétri contenant un disque vide.
- Une boîte de Pétri contenant le milieu gélosé (MH) avec un disque imbibé du solvant.

IX.1.7. Test des antibiotiques :

Dans ce teste on a utilisé six types des antibiotiques appliqués sur deux souches bactériennes identifier telle que *Escherichia-coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Les antibiotiques testés sont les suivants : Acide fusidique, Céfazoline, Ceftazidime, Clindamycine, Imipénème, Sulfamethoxazole,

IX.2. Evaluation de l'activité antifongique :

IX.2.1. Provenance de la souche :

Nous avons testée 02 souches fongiques (*Aspergillus flavus* et *Penicillium Purpurogenum* pour les différents extraits. Ces souches ont été isolées à partir du café et identifiées au V.R.V.S.A, Université Tahri Mohamed de Béchar. L'identification de ces moisissures a été exclusivement basée sur l'observation des caractères cultureux et morphologiques.

Ces espèces pures sont reprises sur des tubes de PDA inclinés et incubés à $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant une semaine ou plus et conservés à 4°C .

IX.2.2. Purification des souches étudiées :

Pour l'étude du pouvoir antifongique, on a utilisé des souches fongiques qui sont déjà identifiées. La purification s'effectue par passages successifs sur le milieu Potato Dextrose Agar (PDA) pour les moisissures jusqu'à l'obtention des colonies homogènes pures.

IX.2.3. Les tests antifongiques :

IX.2.3.1. La préparation de la suspension sporale :

Les espèces récupérées d'une culture pure de 7 jours sont consisté à inoculer à l'aide d'une anse de platine dans des tubes à hémolyses remplie par une solution qui contiens l'eau distillée stérile a 0.2g d'agar et quelques goutte de tween 80, après on agite les tubes par le vortex.

IX.2.3.2. Etude de l'effet des extraits sur la germination des spores :

Protocole expérimental :

Une suspension sporale est récoltée et ajustée à 10^5 spores/ml de l'eau distillée à l'aide de cellule de Mallasses. On étale 0.1ml de cette suspension sur des boites de pétri contenant 13.5ml du milieu de culture plus 1.5ml de chaque concentration (0.063, 0.125, 0.25, et 0.5mg/ml) pour chaque extrait. L'incubation se fait à 25°C pendant 20 heures. Le comptage des spores, germées ou non, est déterminé sous microscope. Une spore est considérée germée si la longueur du tube germinatif est supérieure à son plus petit diamètre. (Serghat, S. *et al*, 2004), un témoin est réalisé dans les mêmes conditions sans extrait.

IX.2.3.3. Etude de l'effet des extraits sur la croissance radiale sur milieu solide :

Principe :

Dans des tubes à essai contenant 13.5ml de la gélose PDA, on a ajouté 1.5ml de différentes dilutions d'extrait 0.063, 0.125, 0.25, 0.5, mg/ml. On agit jusqu'à la dispersion des extraits dans la gélose puis on a coulé les milieux dans les boites de pétri. Après la solidification de la gélose on a ensemencé la souche fongique par le dépôt (au centre de la boite) d'un disque du mycélium d'environ 0,6 cm de diamètre à partir d'une culture jeune l'incubation s'effectue à 25°C pendant 7 jours.

Expression des résultats :

Le taux d'inhibition des extraits est déterminé selon la formule ci-dessous :

$$E (\%) = \frac{X - X_i}{X} \times 100$$

X : estimation de la germination, de la croissance ou de la sporulation dans un milieu sans extrait (témoin).

X_i : estimation de la germination, de la croissance ou de la sporulation en présence d'extrait (essai).

Les résultats et les discussions de ces expériences sont détaillés dans le chapitre suivant.

Remarque :

En ce qui concerne l'activité antimicrobienne de la plante *Prunus persica*, les souches bactériennes et fongiques testées ont montrées une grande résistance vis-à-vis toutes les concentrations des extraits préparées, ce qui indique que la plante PP ne possède aucun effet inhibiteur significatif contre les souches choisies (Voir annexe 08).

X. Activité antibactérienne in-vivo (effet de cicatrisation) :

Après avoir les résultats de l'activité antibactérienne in vitro, on a ciblé quatre extraits qui ont révélés très actifs sur la souche bactérienne *Pseudomonas aeruginosa*.

Ce test consiste à :

- Créer des plaies sur des animaux (Annexe 09).
- Ensemencer ces plaies par un inoculum des colonies bactériennes de la souche *Pseudomonas aeruginosa*.
- Traiter avec la préparation de l'extrait à tester

X.1. Les extraits testés :

Une dose de (1ml) de concentration (1 mg/ml) de chaque extrait. Ces extraits sont : Extraits flavonoïdes (fractions acétate d'éthyle, éther diéthylique, et la fraction butanolique), l'extrait des tanins, ainsi que l'extrait des saponosides des feuilles de la plante *Thapsia garganica*.

X.2. L'animal expérimental :

Les animaux utilisés étaient des lapins de même âge et même sexe d'une race locale de la région de Saida.

L'expérience a été réalisée sur six lots, chaque lot contient un lapin. Le premier lot est considéré comme témoin, et les autres lapins ont été traités par les différents extraits.

X.3. L'aliment :

Les lapins sont alimentés par un même aliment. L'aliment standard a été acheté auprès un Office National de Bétails de Saida. L'eau à boire a été ramenée du robinet.

X.4. Hygiène et prophylaxie :

L'hygiène des bâtiments d'élevage est assurée par un nettoyage à chaque weekend de sol (eau et eau de javel).

X.5. Contrôle effectué :

Chaque lapins une fiche technique où sont mentionnées toutes les observations, les mesures faites pendant les essais sont notés :

- Date et numéro de lot de lapin.
- Diamètre de la plaie.
- Température du lapin.

X.6. Excision chirurgicale des lambeaux cutanés :

- Un cercle d'environ 1 cm de longueur et de 1 cm de largeur est délimité par quatre points sur la peau de la région dorso, puis il est excisé.
- L'excision des plaies a été réalisée à l'aide d'une lame bistouri stérile.
- Les plaies d'excision sont immédiatement traitées après l'intervention chirurgicale.
- Les animaux sont placés dans des cages individuelles avec des litières propres.

X.7. Traitement des plaies :

Ils seront traités une fois par jours avec une application locale en utilisant (une seringue à insuline) de différents extraits.

X.8. Evaluation des paramètres (Température et cicatrisation) :

- L'évolution de la température corporelle des animaux est mesurée chaque jour.
- L'appréciation de la température est réalisée à l'aide d'un thermomètre rectale, avec une précision de 1/100 °C.

X.9. Evaluation du processus cicatriciel (photographie, planimétrie des plaies) :

Après les avoir photographiées, les dimensions (longueur, largeur) des plaies d'excision ont été mesurées jour/jour pendant la période d'essai à l'aide d'un pied à coulisse numérique et papier millimètre + papier transparent pour la précision.

Remarque :

À cause du mal fonctionnement de spectrophotomètre UV-visible au niveau des laboratoires de biologie à l'université Moulay Tahar – Saida, on a dû calculer les charges bactériennes par la méthode de dénombrement des colonies sur les boîtes Pétrie.

La technique des comptes de surface permet de connaître le nombre d'unités prélevées pouvant former une colonie (UFC). Selon cette technique, chaque colonie formée à la surface de la gélose provient d'une bactérie (moisissures) ou d'un agrégat de bactéries (moisissures).

Cette méthode ne tient compte que des micro-organismes viables qui peuvent se développer dans les conditions de croissance utilisées.

À l'aide d'un crayon gras indélébile, on marque la colonie une fois qu'elle a été comptée. Si le nombre de colonies est très élevé, on compte seulement une fraction de la surface et on multiplie son résultat par l'inverse de cette fraction pour obtenir le compte total (Geneviève M. *et al.*, 2011).

XI. Analyses statistiques :

Les résultats obtenus ont été exprimés par une moyenne et plus ou moins l'écart type. Les valeurs d'CI₅₀, CE₅₀ et TCE₅₀ ont été calculées à partir des équations linéaires ou logarithmiques. Les coefficients de corrélation entre les composés phénoliques et les méthodes de l'activité antioxydante et antimicrobienne ont été démontrés en utilisant EXCEL 2013. Les courbes des pourcentages d'inhibition du DPPH ainsi que le suivie cinétique de l'activité antioxydante ont été tracés par MATLAB 2017.



CHAPITRE 04

Résultats

I. Résultat du criblage phytochimique :

Le screening phytochimique (Annexe 01) nous a permis de mettre en évidence la présence de métabolites secondaires au niveau des parties étudiées des plantes. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilités des constituants, des réactions de précipitation et de turbidité, un changement de couleur spécifique ou un examen sous la lumière ultraviolet.

II. Rendements des extraits :

Le tableau 08 récapitule tous les extraits préparés, leurs aspects physiques, couleurs, rendements et les solvants qui les solubilisent.

Tableau 08 : Rendement et caractéristiques des différents extraits préparés à partir de *Thapsia garganica* L. et *Prunus persica* L.

La plante	Extrait	Aspect physique	Couleur	Rendement (%)	solubilité
Les feuilles de <i>Thapsia garganica</i>	Flavonoïdes fraction acétate d'éthyle	Visqueux	Vert foncé	1,82	MeOH
	Flavonoïdes fraction éther éthylique	Visqueux	Vert foncé	0,33	MeOH
	Flavonoïdes fraction butanolique	Solide	Marron foncé	1,08	Eau et MeOH
	Tanins	Poudre	Vert claire	0,45	Eau et MeOH
	Saponosides	Solide	Jaune foncé	7,6	Eau et MeOH
	Brute méthanolique	Visqueux	Noir	8,1	Eau et MeOH
	Huiles essentielles	Liquide huileux	Vert bleu	18,10	DMSO
Les racines De <i>Thapsia garganica</i>	Tanins	Visqueux	Marron claire	0,61	Eau et MeOH
	Saponosides	Solide	Marron claire	3,04	Eau et MeOH
	Alcaloïdes	Visqueux	Marron foncé	2,09	Eau et MeOH
	Brut méthanolique	Solide	Marron	5,02	Eau et MeOH
Les feuilles De <i>Prunus Persica</i> L.	Flavonoïdes fraction acétate d'éthyle	Visqueux	Vert foncé	1,27	MeOH
	Flavonoïdes fraction éther éthylique	Visqueux	Vert foncé	0,66	MeOH
	Flavonoïdes fraction butanolique	Visqueux	Marron foncé	3,31	Eau et MeOH
	Tanins	Poudre	Marron	3,62	Eau et MeOH
	Saponosides	Poudre	Marron	1,09	Eau et MeOH
	Brute méthanolique	Visqueux	Noire	3,83	Eau et MeOH

III. Résultats des analyses physico-chimiques des huiles essentielles de TG :

Le contrôle analytique des huiles essentielles est basé sur la détermination des caractéristiques physiques (densité, indice de réfraction ...) ainsi que des caractéristiques chimiques (indice d'acide, d'ester...) permettant d'évaluer la nature de composé organique (acide, ester.....) présente dans l'essence. Ces essais sont déterminés selon un protocole précis et obéissent à des normes édictées par l'association française de normalisation (**AFNOR**); les résultats obtenus sont rapporté dans les tableaux suivant (**Tableau 09 et Tableau 10**):

Tableau 09 : Résultats des analyses physiques d'huile essentielle des feuilles de TG :

Paramètres	Résultats
Densité relative	0.46
Indice de réfraction	1.418
Pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{20}$	-0.25

Tableau 10 : Résultats des analyses chimiques d'huile essentielle de *thapsia garganica*.

Paramètres	Résultats
Indice d'acide	2.22 mg KOH/g
Indice de saponification	14.025 mg KOH/g
Indice d'ester	11.80 mg KOH/g
Indice peroxyde	1meq d'O ₂ /g

La détermination des propriétés physico-chimiques est une étape nécessaire mais demeure non suffisante pour caractériser l'HE. Il sera donc primordial de déterminer le profil chromatographique de l'essence aromatique.

IV. Résultats des analyses chimiques des différents extraits par les techniques spectroscopiques et chromatographiques :

IV.1. Chromatographie sur couche mince :

Toute étape de purification commence par une CCM analytique, non seulement pour vérifier l'efficacité d'un système de solvants, mais aussi pour dénombrer les produits à isoler.

Il est rare en effet, de pouvoir séparer tous les composants d'un mélange complexe. Il faut bien souvent se contenter d'isoler le(s) produit(s) majoritaire(s).

Les meilleurs résultats obtenus de la chromatographie sur couche mince sont regroupées à l'annexe N° 02.

IV.2. Les résultats de la séparation par chromatographie sur colonne CC :

IV.2.1. Extrait étheré de *Prunus persica* :

La séparation sur colonne a débuté par une recherche sur plaques analytiques de gel de silice 60, du meilleur système d'élution. Les tests effectués sur l'extrait étherique de la plante PP ont montré que la meilleure séparation est obtenue avec le système (Acétate d'éthyle / MeOH) dans les proportions 9 /1. Les plaques ont été visualisées sous lampe UV à 254 et 365 nm, puis révélées avec l'acide sulfurique et chauffées pendant 3 mn à 100°C.

Tableau 11 : Regroupement des fractions issues de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait étheré de la plante PP.

Fraction	Poids (g)	Rendement (%)	Observation
F1→ F4	0.01	14	Produit pur
F5 →F11	0.01	14	Mélange de deux produits
F12→ F15	0.02	28	Mélange complexe
F16→ F45	0.02	28	Mélange de deux produits

IV.2.2. Extrait d'acétate d'éthyle de *Prunus persica* :

Les tests effectués sur la fraction d'acétat ethyle de l'extrait flavonoide de la plante PP ont montré que la meilleure séparation est obtenue avec le système (Toluène / MeOH / EtOH) dans les proportions 7/2/1.

Le tableau suivant regroupe les fractions issues de la séparation par colonne de l'extrait d'acétate d'éthyle de la plante *Prunus persica*.

Tableau 12 : Regroupement des fractions issues de la séparation par colonne de l'extrait d'acétate d'éthyle de la plante PP.

Fraction	Poids (g)	Rendement (%)	Observation
F1 → F7	0.01	2.22	Produit pur
F8 → F28	0.02	4.44	Produit pur
F29 → F65	0.11	24	Mélange complexe
F66 → F80	0.06	13	Mélange complexe
F81 → F91	0.03	6.7	Produit pur
F92 → F103	0.04	8.9	Mélange complexe
F104	0.01	2.22	Produit pur
F105 → F111	0.06	13.3	Aucun produit
F112 → F130	0.06	13.3	Mélange de deux produits

IV.2.3. Extrait d'acétate d'éthyle de *Thapsia garganica* :

La fraction d'acétate d'éthyle de l'extrait flavonoïde de la plante TG a été dissous dans le méthanol et déposée sur une colonne de gel de silice préparé dans un système de (Acétate d'éthyle / MeOH/ H₂O) dans les proportions 7/2/1.

Tableau 13 : Regroupement des fractions issues de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait d'acétate d'éthyle de la plante TG.

Fraction	Poids (g)	Rendement (%)	Observation
F1	0.02	13.3	Produit pur
F2	0.04	26.67	Mélange de deux produits
F3	0.07	46.67	Mélange complexe

Remarque :

- Après l'essai de plusieurs systèmes d'élution pour la séparation par CCM, on n'a pas pu trouver un bon système d'élution pour séparer les tanins de la plante TG.
- Pour la plante PP, La quantité de l'extrait des tanins était très faible par rapport au gel de silice, ce qui nous a conduit à une mauvaise séparation sur colonne.

IV.3. Résultats des analyses chromatographiques d'huile essentielle des feuilles de TG :

L'analyse de la composition chimique des huiles essentielles issues des feuilles de *Thapsia garganica* a permis d'identifier 50 composés représentant 96,63 % de l'huile (Tableau 14).

Tableau 14 : Composition chimique (%) des composés identifiés des huiles essentielles des feuilles de *Thapsia garganica*.

Pic	Composé	IR	Formule chimique	SP (%)	Poids (mole)	Pic	Composé	IR	Formule chimique	SP (%)	Poids (mole)
1	3-Furaldehyde	831	C ₅ H ₄ O ₂	7,69	96	30	2(3H)-Furanone, dihydro-5-pentyl-	1284	C ₉ H ₁₆ O ₂	0,46	156
-	Furfural	831	C ₅ H ₄ O ₂		96	-	2(3H)-Furanone, 5-heptyldihydro-	1483	C ₁₁ H ₂₀ O ₂		184
2	2-Furanmethanol	885	C ₅ H ₆ O ₂	10,96	98	31	2-(4-Methoxyphenyl)ethanol	1325	C ₉ H ₁₂ O ₂	1,46	152
3	Pentane, 2,3-dimethyl-	589	C ₇ H ₁₆	0,34	100	32	Ethanone, 1-(1,3a,4,5,6,7-hexahydro-4-hydroxy-3,8-dimethyl-5-azulenyl)-	1758	C ₁₄ H ₂₀ O ₂	25,69	220
4	Pentanoic acid	875	C ₅ H ₁₀ O ₂	0,18	102	-	(+)-3-Carene, 10-(acetylmethyl)-	1382	C ₁₃ H ₂₀ O		192
-	Butanoic acid	775	C ₄ H ₈ O ₂		88	33	Vanillin	1392	C ₈ H ₈ O ₃	152	
5	2-Butenoic acid, 2-methyl-, (Z)-	860	C ₅ H ₈ O ₂	0,07	100	-	3-Methoxy-4-hydroxy mandelonitrile	1710	C ₉ H ₉ NO ₃	0,10	179
-	Tiglic acid	860	C ₅ H ₈ O ₂		100	-	Benzaldehyde, 3-hydroxy-4-methoxy-	1392	C ₈ H ₈ O ₃		152
6	Menthylamine	1181	C ₁₀ H ₂₁ N	0,09	155	34	(2-amino-5-methyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amine	1803	C ₇ H ₉ N ₅	0,57	163
-	L-Prolinamide	1216	C ₅ H ₁₀ N ₂ O		114	-	Silane, (4-ethylphenyl)trimethyl-	1115	C ₁₁ H ₁₈ Si		178
-	Proline	1163	C ₅ H ₉ NO ₂		115	-	Silane, dodecyltriethoxy-	1948	C ₁₈ H ₄₀ O ₃ Si		332
7	Propanal, 3-(methylthio)-	858	C ₄ H ₈ OS	0,18	104	35	syn-Tricyclo[5.1.0.0(2,4)]oct-5-ene, 3,3,5,6,8,8-hexamethyl-	1194	C ₁₄ H ₂₂	0,31	190

CHAPITRE 04 : Résultats

8	2,6-dimethyl pyrazine	894	C ₆ H ₈ N ₂	0,51	108	-	4-(2,4,4-Trimethyl-cyclohexa-1,5-dienyl)-but-3-en-2-one	1440	C ₁₃ H ₁₈ O	0,31	190
-	Cyclopropane, tetramethylmethylene-	696	C ₈ H ₁₄		110	36	2(3H)-Furanone, 5-hexyldihydro-	1383	C ₁₀ H ₁₈ O ₂		170
-	1,1,2,2-Tetramethyl-3-methylenecyclopropane	696	C ₈ H ₁₄		110	-	2(3H)-Furanone, 5-heptyldihydro-	1483	C ₁₁ H ₂₀ O ₂		184
-	2,4-Hexadiene, 2,3-dimethyl-	787	C ₈ H ₁₄		110	37	4-(2,6,6-Trimethylcyclohexa-1,3-dienyl)but-3-en-2-one	1440	C ₁₃ H ₁₈ O		1,67
9	5-Methyl furfural	920	C ₆ H ₆ O ₂	0,13	110	38	Methanone, dicyclohexyl-	1576	C ₁₃ H ₂₂ O	0,61	194
-	s-Hydroxymethylthiobenzoate	1523	C ₈ H ₈ O ₂ S		168	-	4-Hexen-2-one, 3,3-diethyl-4,5-dimethyl-	1228	C ₁₂ H ₂₂ O		182
-	Benzaldehyde	982	C ₇ H ₆ O		106	-	2-Hydroxy-6-methoxy-3,5-dimethyl-1,4-benzoquinone	1501	C ₉ H ₁₀ O ₄		182
10	Hexanoic acid	974	C ₆ H ₁₂ O ₂	1,47	116	39	2(4H)-Benzofuranone, 5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-, (R)-	1426	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	0,28	180
11	Hexanoic acid	974	C ₆ H ₁₂ O ₂	0,98	116	40	Dodecanamide, N,N-bis(2-hydroxyethyl)-	2298	C ₁₆ H ₃₃ NO ₃	0,61	287
12	1H-Pyrrole-2-carboxaldehyde	988	C ₅ H ₅ NO	1,23	95	-	[Dodecanoyl(methyl)amino]acetic acid	2070	C ₁₅ H ₂₉ NO ₃		271
13	1,2-Ethanediol, 1,2-diphenyl-, (R*,R*)-(./-.)-	1891	C ₁₄ H ₁₄ O ₂	0,09	214	-	Dodecanoic Acid	1570	C ₁₂ H ₂₄ O ₂		200
-	Benzyl alcohol	1036	C ₇ H ₈ O		108	41	1,4-Dimethylazulene	1248	C ₁₂ H ₁₂	0,50	156
14	Benzene acetaldehyde	1081	C ₈ H ₈ O	0,30	120	-	Naphthalene, 1,8-dimethyl-	1458	C ₁₂ H ₁₂		
15	Ethanone, 1-(1H-pyrrol-2-yl)-	1035	C ₆ H ₇ NO	6,49	109	-	Naphthalene, 2,3-dimethyl	1458	C ₁₂ H ₁₂		

CHAPITRE 04 : Résultats

16	Pentanoic acid	875	C ₅ H ₁₀ O ₂	6,17	102	42	2-Butanone, 1-(2,3,6-trimethylphenyl)	1567	C ₁₃ H ₁₈ O	1,01	190
-	Hexanoic acid	974	C ₆ H ₁₂ O ₂		116	-	1-Naphthalenol, 1,2,3,4-tetrahydro-2,5,8-trimethyl-	1642	C ₁₃ H ₁₈ O		190
-	Heptanoic acid	1073	C ₇ H ₁₄ O ₂		130	-	1,2,3,4-Tetrahydro-4,5,7-trimethyl-1-naphthol	1642	C ₁₃ H ₁₈ O		190
17	trans-Linalool oxide (furanoid)	1164	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	0,33	170	-	Benzene, 1-cyclopropylmethyl-4-(1-methylethyl)-	1342	C ₁₃ H ₁₈	2,57	174
-	Ethyl 2-(5-methyl-5-vinyltetrahydrofuran-2-yl)propan-2-yl carbonate	1529	C ₁₃ H ₂₂ O ₄		242	43	Butyrovanillone	1638	C ₁₁ H ₁₄ O ₃		194
18	5-(1-Hydroxy-1-methylethyl)-2-methyl-2-cyclohexen-1-ol	1331	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	0,56	170	-	alpha.-Amino-3'-hydroxy-4'-methoxyacetophenone	1682	C ₉ H ₁₁ NO ₃	2,57	181
-	Phenol, 2-methoxy-	1090	C ₇ H ₈ O ₂		124	-	1-Propanone, 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-	1538	C ₁₀ H ₁₂ O ₃		180
19	Linalool	1082	C ₁₀ H ₁₈ O	1,48	154	44	Diisooctyl phthalate	2704	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	0,18	390
20	(+)-(1R,2S,4R,7S,8S,11R)-3,3,11-Trimethyltricyclo[6.3.0.0(2,4)]undecan-7-ylmethanol methanesulfonate	2062	C ₁₆ H ₂₈ O ₃ S	1,19	300	-	Di-3,7-dimethyl-1-octyl phthalate	2973	C ₂₈ H ₄₆ O ₄		446
-	Benzyl 2-Amino-2-methyl-4-pentynoate	0	C ₁₃ H ₁₆ NO ₂		218	-	1,2-Benzenedicarboxylic acid, decyl octyl ester	3031	C ₂₆ H ₄₂ O ₄		418
-	Oleyl Alcohol	2061	C ₁₈ H ₃₆ O		268	-	1,2-Benzenedicarboxylic acid, diundecyl ester	3428	C ₃₀ H ₅₀ O ₄		474
-	Benzyl (S)-2-Amino-2-methyl-4-pentynoate	1714	C ₁₃ H ₁₅ NO ₂		217	-	2-hexan-3-yloxycarbonylbenzoic acid	1963	C ₁₄ H ₁₈ O ₄		250

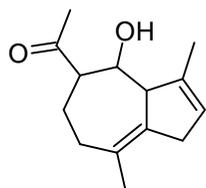
CHAPITRE 04 : Résultats

-	9,9-bis(chloranyl)dispiro[3.0.3 ⁵ .2 ⁴]decan-10-one	1450	C ₁₀ H ₁₂ C ₁₂ O		218	45	2-Naphthalenemethanol, decahydro-.alpha.,.alpha.,4a-trimethyl-8-methylene-, [2R-(2.alp	1593	C ₁₅ H ₂₆ O		222
21	Benzeneethanol	1136	C ₈ H ₁₀ O	1,35	122	-	2-Naphthalenemethanol, 2,3,4,4a,5,6,7,8-octahydro-.alpha.,.alpha.,4a,8-tetramethyl-, [2R	1598	C ₁₅ H ₂₆ O	0,22	222
22	Octanoic acid	1173	C ₈ H ₁₆ O ₂	0,26	144	-	Rosifoliol	0	C ₁₅ H ₂₄ O		220
23	(1S)-1,3,3-trimethylnorbornan-2-ol	1138	C ₁₀ H ₁₈ O		154	46	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	1908	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	0,86	278
-	L-.alpha.-Terpineol	1143	C ₁₀ H ₁₈ O	1,85	154	47	1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl 2-methylpropyl ester	1973	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	0,33	278
24	Benzofuran, 2,3-dihydro	1036	C ₈ H ₈ O	0,15	120	48	2-Hydroxybenzimidazole, 2TBDMS derivative	2125	C ₁₉ H ₃₄ N ₂ OSi ₂		362
25	Geraniol	1228	C ₁₀ H ₁₈ O	0,12	154	-	N-[3-(4-Butoxy-phenyl)-10-oxo-10H-9-oxa-2,4-diazaphenanthren-1-yl]-propionamide	3713	C ₂₄ H ₂₃ N ₃ O ₄	0,56	417
						-	3,4-Dichloro-1-tributylsilyloxybenzene	2233	C ₁₈ H ₃₀ C ₁₂ OSi		360
26	Nonanoic acid	1272	C ₉ H ₁₈ O ₂	5,90	158	-	1-Diphenyl(tert-butyl)silyloxy-4-methoxybenzene	2528	C ₂₃ H ₂₆ O ₂ Si		362
27	2-methoxy-4-vinyl-phenol	1293	C ₉ H ₁₀ O ₂	0,93	150	49	ethanone, 1-(5,8-dimethyl-1-naphthalenyl)-	1806	C ₁₄ H ₁₄ O	1,71	198

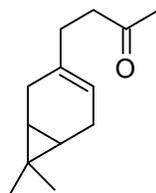
CHAPITRE 04 : Résultats

28	n-Decanoic acid	1372	$C_{10}H_{20}O_2$	0,09	172	-	4-Biphenyl methyl carbinol	1742	$C_{14}H_{14}O$	198	
29	Eugenol	1392	$C_{10}H_{12}O_2$	4,24	164	-	Azulene, 1,4-dimethyl-7-(1-methylethyl)-	1472	$C_{15}H_{18}$	198	
						50	Phenol, 2,2'-methylenebis[6-(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-	2788	$C_{23}H_{32}O_2$	1,29	340
							Total : 96,63 % Monoterpènes hydrocarbonés : 0,81% Sesquiterpènes hydrocarbonés : 1,71% Monoterpènes oxygénés : 42,27% Sesquiterpènes oxygénés : 1,97% Autres : 49,87%				

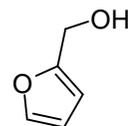
IV.4. Structures chimiques avec nomenclatures des composés majoritaires identifiées dans l'huile essentielle de TG :



Ethanone, 1-(1,3a,4,5,6,7-hexahydro-4-hydroxy-3,8-dimethyl-5-azulenyl)



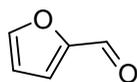
(+)-3-Carene, 10-(acetylmethyl)



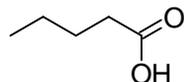
2-Furanmethanol



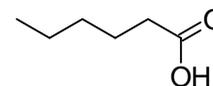
3-Furaldehyde



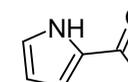
Furfural



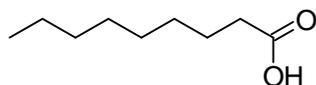
Pentanoic acid



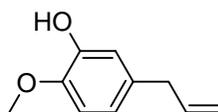
Hexanoic acid



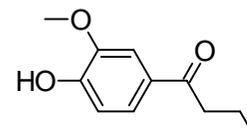
Ethanone, 1-(1H-pyrrol-2-yl)



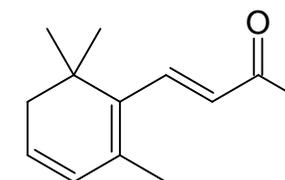
Nonanoic acid



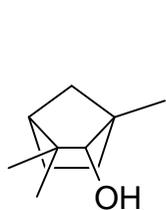
Eugenol



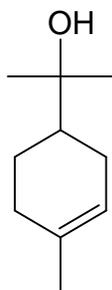
Butyrovannillone



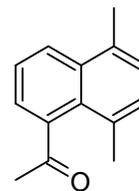
4-(2,6,6-Trimethylcyclohexa-1,3-dienyl)but-3-en-2-one



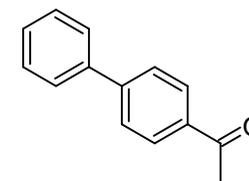
(1S)-1,3,3-trimethylnorbornan-2-ol



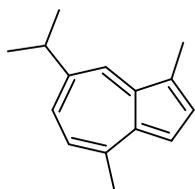
L- α -Terpineol



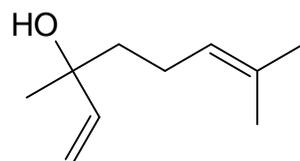
ethanone, 1-(5,8-dimethyl-1-naphthalenyl)



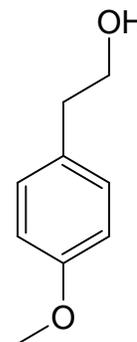
4-Biphenyl methyl carbinol



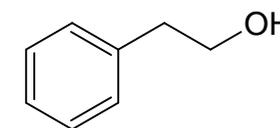
Azulene, 1,4-dimethyl-7-(1-methylethyl)



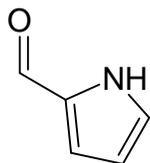
Linalool



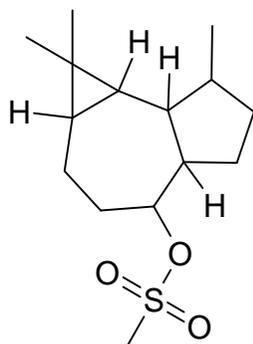
2-(4-Methoxyphenyl)ethanol



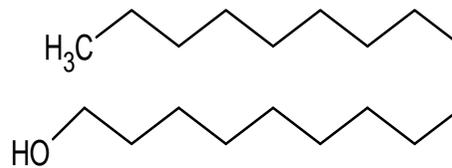
Benzeneethanol



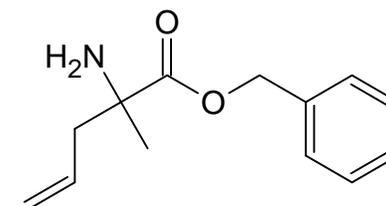
1H-Pyrrole-2-carboxaldehyde



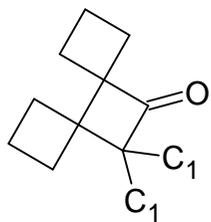
(+)-(1R,2S,4R,7S,8S,11R)-3,3,11-
Trimethyltricyclo[6.3.0.0(2,4)]
undecan-7-ylmethanol
methanesulfonate



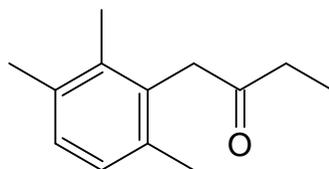
Oleyl Alcohol



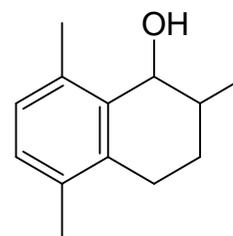
Benzyl (S)-2-Amino-2-methyl-4-
pentynoate



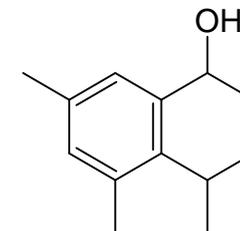
9,9-bis(chloranyl)dispiro
[3.0.3⁵.2⁴] decan-10-one



2-Butanone, 1-(2,3,6-
trimethylphenyl)



1-Naphthalenol, 1,2,3,4-tetrahydro-
2,5,8-trimethyl



1,2,3,4-Tetrahydro-4,5,7-trimethyl-
1-naphthol

IV.5. Résultats d'identification des groupements fonctionnels par spectroscopie Infra-

Rouge :

Après le regroupement des fractions qui ont possédées les même Rf, l'analyse par spectroscopie IR de ces fractions a révélé la présence de 06 composés, tel que : Extrait Acétate d'éthyle TG fraction N°1 (**TGAE1**), Extrait Acétate d'éthyle TG fraction N°2 (**TGAE2**), Extrait Acétate d'éthyle PP fraction N°4 (**PPAE4**), Extrait Acétate d'éthyle PP fraction N°6 (**PPAE6**), Extrait Acétate d'éthyle PP fraction N°8 (**PPAE8**) et l'extrait Ether di étherique PP fraction N°3 (**PPEE3**).

Les spectres obtenus ont été comparés avec celle d'éluant utilisé (Acétone) (Voir Annexe N°03).

Composé TGAE1 :

Le spectre IR du Composé **TGAE1** montre la présence des groupements fonctionnels suivants :

- Une bande large à $3352,7\text{ cm}^{-1}$ est assignée au groupement **OH** d'un alcool (liaison hydrogène).
- Deux pics à $2922,2\text{ cm}^{-1}$ et $2853,3\text{ cm}^{-1}$ correspondant aux **C-H (Sp³)** : **CH** et **CH₂** de la chaîne aliphatique. Plus les bandes à $1459,3\text{ cm}^{-1}$ confirmant la présence du **CH₂** de la chaîne aliphatique et à $1377,3\text{ cm}^{-1}$ caractéristique du groupe **CH₃**.
- Un pic à $1740,7\text{ cm}^{-1}$ représentant le groupement **C=O** d'une lactone.
- Une bande à $1559,9\text{ cm}^{-1}$ correspondant à la vibration de la liaison carbonyle **C=O**.
- Des pics situées à $780,9$; $721,2$ et $661,6\text{ cm}^{-1}$ caractérisent la liaison **C-H (Sp²)**.

(Oliveira, R. N. *et al.*, 2016 ; Fernandes Queiroz *et al.*, 2015 ; Santiago Cintrón, M., *et al.*, 2016).

Composé TGAE2 :

L'examen du spectre IR du composé **TGAE2** révèle quatre bandes d'absorption :

- Une bande à $3429,2\text{ cm}^{-1}$ attribuée au groupement **OH** d'un alcool.
- Les deux bandes à $2924,1\text{ cm}^{-1}$ et $2853,3\text{ cm}^{-1}$ correspondant aux **C-H (Sp³)** : **CH₂** et **CH₃**. Cette présence est justifiée par les bandes à $1459,3\text{ cm}^{-1}$ confirmant la présence du **CH₂** de la chaîne aliphatique et à $1364,2\text{ cm}^{-1}$ caractéristique du groupe **CH₃**.
- Un pic situé à $1597,2\text{ cm}^{-1}$ correspondant au groupement **COO⁻** du groupe carboxyle (Chai, M. N., & Isa, M. I. N. ; 2013).
- La zone $1200-700\text{ cm}^{-1}$ comprend de nombreuses vibrations attribuables aux chaînes saturées et insaturées, le pic à $721,2\text{ cm}^{-1}$ caractéristique d'un **C-H (Sp²)**.

Composé PPAE4 :

Dans la figure 20, on peut observer les groupements fonctionnels suivants :

- Une bande large dans la région $3337,8\text{ cm}^{-1}$, correspond à la liaison hydrogène liée du groupement **OH** d'un alcool.
- Les deux bandes à $2924,1\text{ cm}^{-1}$ et $2853,3\text{ cm}^{-1}$ correspondant aux **C-H (Sp³)** : **CH₂** et **CH₃**. Cette présence est justifiée par les bandes à $1459,3\text{ cm}^{-1}$ confirmant la présence du **CH₂** de la chaîne aliphatique et à $1362,3\text{ cm}^{-1}$ caractéristique du groupe **CH₃**.
- Un pic situé à $1654,9\text{ cm}^{-1}$ due aux vibrations d'élongation des liaisons **C=C** d'un cycle aromatique (**Bourahla, S., 2018**).
- Une bande d'absorbance environ $1230,0\text{ cm}^{-1}$ peut être attribué au **C-O** des polyols.
- Une bande forte située à $1028,7\text{ cm}^{-1}$, probablement reliée à l'étirement **C-O**. (**Moacir Fernandes Queiroz 2015**). Ou bien, elle correspond à la région de flexion **C-O** d'une vibration **C-O** de cellulose non spécifiée (**C₆ - O₆ - H**) (**Santiago Cintrón, M., et al., 2016**).

Composé PPAE6 :

L'interprétation de spectre IR du composé **PPAE6** mène aux remarques suivantes :

- Une bande large à la zone $3386,3\text{ cm}^{-1}$ attribuée au groupement **OH** d'un alcool.
- Les deux bandes à $2924,1\text{ cm}^{-1}$ et $2853,3\text{ cm}^{-1}$ correspondant aux **C-H (Sp³)** : **CH₂** et **CH₃**. Cette présence est justifiée par les bandes à $1455,5\text{ cm}^{-1}$ confirmant la présence du **CH₂** de la chaîne aliphatique et à $1364,2\text{ cm}^{-1}$ caractéristique du groupe **CH₃**.
- Un pic situé à $1736,9\text{ cm}^{-1}$ caractéristique de la vibration d'élongation **C=O** des groupements carboxyliques (cétones, aldéhydes, lactones ou des groupes carboxyliques) (**Bourahla, S., 2018**).
- Un autre pic situé à $1602,8\text{ cm}^{-1}$ est associée à la vibration d'élongation **C=C** d'un cycle aromatique (**Bourahla, S., 2018**).
- Une bande forte à $1073,5\text{ cm}^{-1}$ peut être relative à la vibration de liaison **C-O** d'un alcool secondaire (**C-OH**).
- Un pic environ $698,9\text{ cm}^{-1}$ est caractéristique d'un **C-H (Sp²)**.

Composé PPAE8 :

Le spectre IR du composé **PPAE8** illustre les bandes de vibration suivantes :

- Une bande large entre $3442,2\text{ cm}^{-1}$ et $3328,5\text{ cm}^{-1}$ attribuée au groupement **OH** d'un alcool.
- Les deux bandes à $2922,2\text{ cm}^{-1}$ et $2853,3\text{ cm}^{-1}$ correspondant aux **C-H (Sp³)** : **CH₂** et **CH₃**. Cette présence est justifiée par les bandes à $1457,4\text{ cm}^{-1}$ confirmant la présence du **CH₂** de la chaîne aliphatique et à $1362,3\text{ cm}^{-1}$ caractéristique du groupe **CH₃**.
- Une bande forte environ à $1599,0\text{ cm}^{-1}$ est attribuée aux vibrations d'élongation de la liaison **C=C** d'un cycle aromatique.
- Une bande environ à $1164,8\text{ cm}^{-1}$ peut être relative à la vibration de liaison **C-O** d'un alcool secondaire (**C-OH**).
- Deux pics à $721,2\text{ cm}^{-1}$ et $700,7\text{ cm}^{-1}$ ont caractéristiques d'un **C-H (Sp²)**.

Composé PPEE3 :

L'examen de spectre IR du composé **PPEE3** révèle quatre bandes d'absorption :

- Une bande à $3429,2\text{ cm}^{-1}$ attribuée au groupement **OH** d'un alcool.
- Les deux bandes à $2927,8\text{ cm}^{-1}$ et $2855,1\text{ cm}^{-1}$ correspondant aux **C-H (Sp³)** : **CH₂** et **CH₃**. Cette présence est justifiée par les bandes à $1438,8\text{ cm}^{-1}$ confirmant la présence du **CH₂** de la chaîne aliphatique et à $1362,3\text{ cm}^{-1}$ caractéristique du groupe **CH₃**.
- Un pic situé à $1742,5\text{ cm}^{-1}$ caractéristique de la vibration d'élongation **C=O** des groupements carboxyliques.
- Une bande forte à $1049,2\text{ cm}^{-1}$ peut être relative à la vibration de liaison **C-O** d'un alcool secondaire ou primaire (**C-OH**), et / ou au groupe ester **C-O** (Oliveira, R. N. *et al.*, 2016).

V. Résultats des analyses spectroscopiques par RMN 1H et RMN 13C :

Les données RMN du 1H et du 13C de l'extrait PPAE4 sont regroupées dans le tableau 15.

Tableau 15 : Données RMN 1H à 300 MHz, 13C à 75 MHz dans le DMSO du composé PPAE4.

Atome	δ_{1H} (multiplicité ; J)	δ_{13C}
1	7,42 (m)	-
2	7,30 (m)	175,03
3	7,19 (s)	141,86
4	6,03 (d; 4,57)	128,34
5	4,83 (d ; 3,09)	127,76
6	3,25 (s)	126,96
7	3,08 (s)	79,88
8	2,47 (s)	79,44
9	2,18 (t ; 7,29)	73,91
10	2,01 (m)	34,14
11	1,47 (s)	31,77
12	1,23 (s)	29,51
13	1,17 (m)	22,58
14	0,93 (m)	14,45

Les spectres RMN du 1H et du 13C de l'extrait PPAE4 sont représentés aux figures 13 et 14.

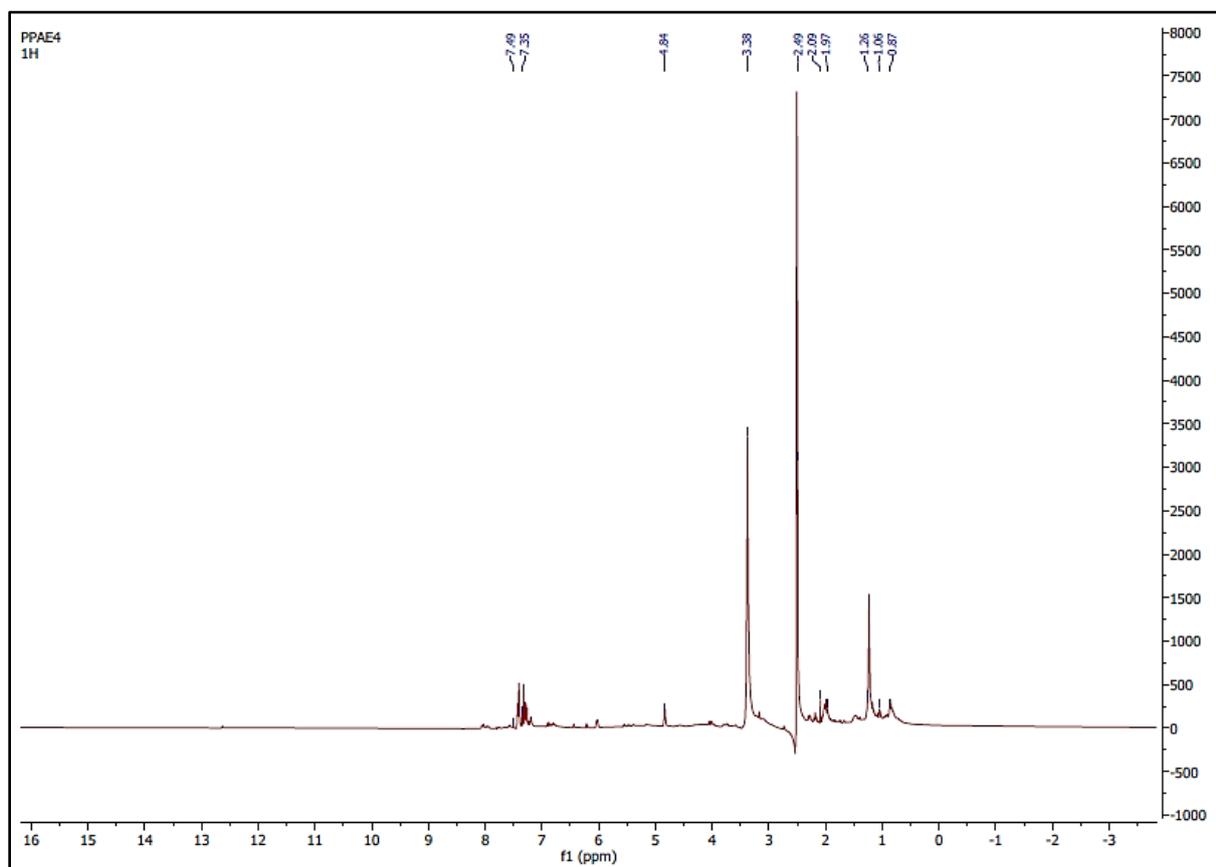


Figure 13 : Spectre de RMN du proton du produit PPAE4.

Le spectre RMN du ^{13}C du PPAE4 effectués dans DMSO-d6 à 75 MHz (Figure 14) montrent la présence de 13 pics relatifs à 13 carbones.

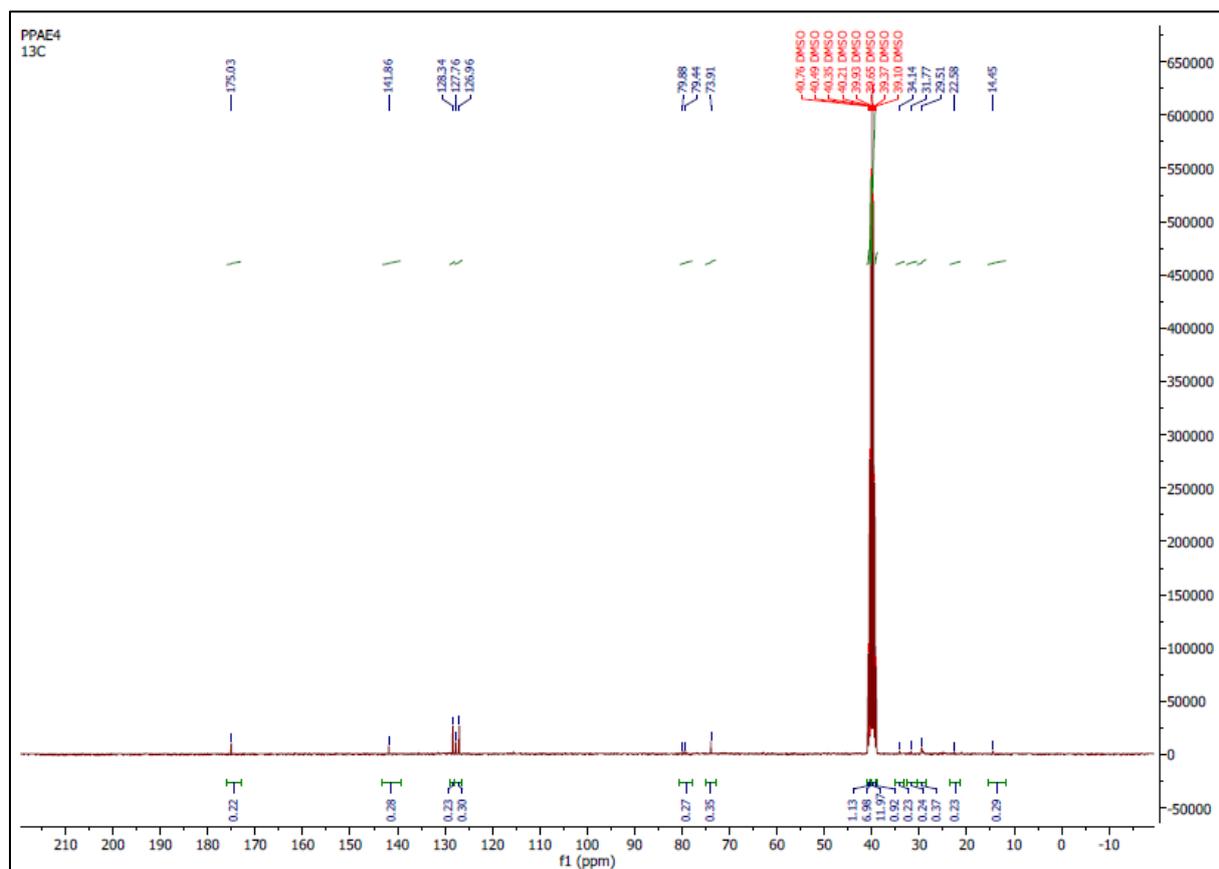


Figure 14 : Spectre de RMN du carbone 13 du produit PPAE4.

Tableau 16 : Données expérimentales RMN (ppm) de composé PPAE4 comparées aux données de la littérature.

Position	Expérimentale		Données de la littérature		
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	Référence
3',4',5'	7,42 (m)	-	7,4 - 7,5 (m)	128,9 – 131,4	Zagane, A. (2011), Magalhães, A. F., <i>et al.</i> (2004)
4	7,30 (m)	175,03	-	175,8	Córdova, W. H. P., <i>et al.</i> (2006)
2'	7,19 (s)	141,86	7,16 (s)	127,0	Cia Máximo, P., <i>et al.</i> (2000)
1' 3', 5'	6,03 (d ; 4,57)	128,34	- 7,50 (d)	128,3 128,9	Foutse, Y. (2017) Zagane, A. (2011), Cuong, D. T. D., <i>et al.</i> (2019)
6'			-	128,4	Karimov, A. M., <i>et al.</i> (2017)
6			6,03 (d)	99,89	Noël, K. J., <i>et al.</i> (2016)
8	4,83 (d ; 3,09)	127,76	-	127,3	Karimov, A. M., <i>et al.</i> (2017)
1'' (glucose)			4,80 (d)	-	Tillequin, F., <i>et al.</i> (1978)
2' 5''' (Rhamno- pyrannosyl)	3,25 (s)	126,96	- 3,25 (s)	126,0 68,4	Zagane, A. (2011) Niassy, B., <i>et al.</i> (2004)
2'', 4''			3,24 (m)	69,93- 74,08	Hadj Salem, J. (2009)
4''' (Rhamno- pyrannosyl)	3,08 (s)	79,88	3,08 (s)	71,9	Niassy, B., <i>et al.</i> (2004)
3'', 5'''			3,09 (m)	67,5- 77,4	Hadj Salem, J. (2009)
CH ₃ 3'' (glucose)	2,47 (s)	79,44	2,43 (s) 4,7 (m)	8,6 78,5	Zagane, A. (2011)
Cβ 2'' (glucose)	2,18 (t ; 7,29)	73,91	- 3,21 ; 3,25 (m)	73,8 73,1 ; 74,08 ;	Zagane, A. (2011) Cuong, D. T. D., <i>et al.</i> (2019), Hadj Salem, J. (2009), Mostafa, E. S., <i>et al.</i> (2021)
2'' (glucose)			-	73,85	
3	2,01 (m)	34,14	2,08 (dd)	-	Magalhães, A. F., <i>et al.</i> (2004)
CH ₃ -iso 5''-Me, 6''-Me	1,47 (s)	31,77	1,44 (s) 1,44 (s)	- 28,1	Zagane, A. (2011) Cia Máximo, P., <i>et al.</i> (2000)
CH ₃ (sucre Rhamnose)	1,23 (s)	29,51	1,2 (d)	-	Mabry, T. J., <i>et al.</i> (1964)
13 (hexyl)	1,17 (m)	22,58	1,17 (m)	-	Ziane, L. (2016)
6''' (Rhamno- pyrannosyl)	0,93 (m)	14,45	0,98 (d) 0,93 (d)	17,3 17,7	Niassy, B., <i>et al.</i> (2004) Noël, K. J., <i>et al.</i> (2016)
6''					

VI. Les résultats de dosage des acides phénoliques :

Les polyphénols totaux ont été déterminés par la méthode de Folin-Ciocalteu. L'acide gallique a été utilisé comme standard. L'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 750nm.

Avant de procéder à la détermination de la teneur en composés phénoliques, nous avons établi une courbe d'étalonnage en utilisant l'acide gallique comme composé de référence. Les résultats obtenus sont représentés dans une courbe d'étalonnage (figure 15), ayant l'équation : $y = 0,3333x - 2 \exp(-17)$, $R^2 = 1$ La quantité des polyphénols a été rapportée en milligramme d'équivalent de l'acide gallique par 100 milligramme de poids sec de l'extrait (en mg d'équivalent EAG/ 100 mg Ps).

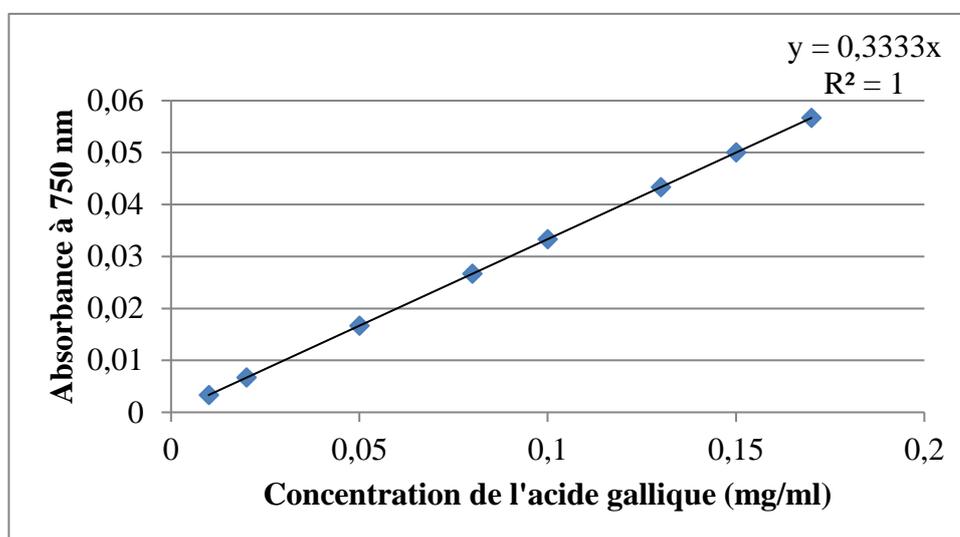


Figure 15 : Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux.

VI.1. Résultats de dosage des polyphénols :

Le dosage des polyphénols totaux, nous donne une estimation globale de la teneur en différentes classes des composés phénoliques contenus au niveau de l'extrait méthanolique et aqueux des feuilles de *Prunus persica*, ainsi que dans l'extrait méthanolique des feuilles et des racines de *Thapsia garganica*.

Les teneurs en composé phénolique des deux échantillons sont consignés dans les figures 16, 17.

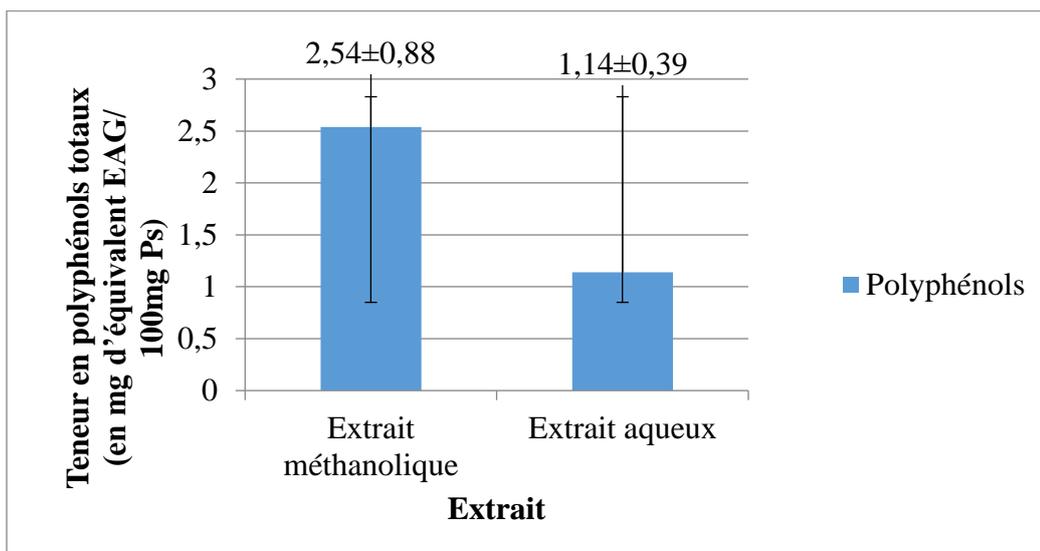


Figure 16 : Teneurs en polyphénols totaux des feuilles de *Prunus persica*.

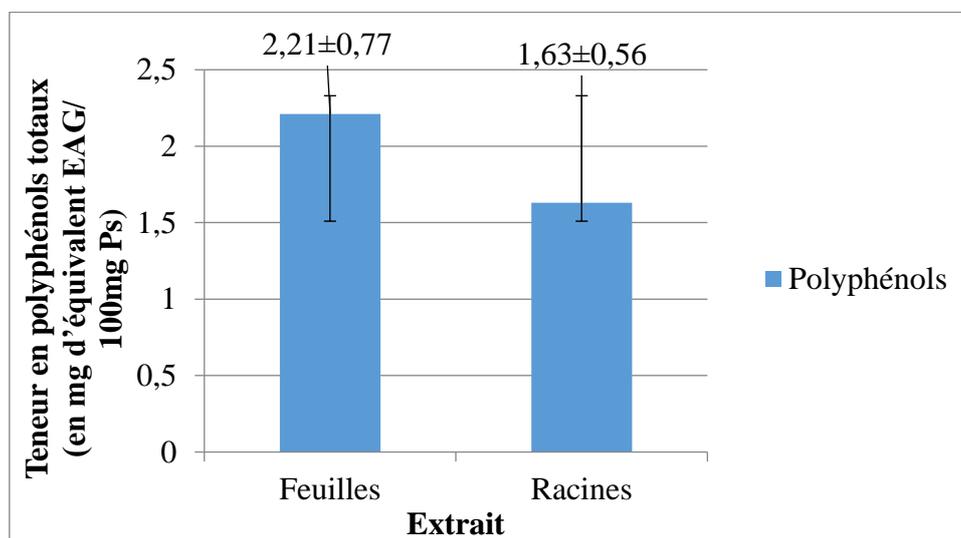


Figure 17 : Teneurs en polyphénols totaux de *Thapsia garganica*.

VI.2. Résultats de dosages des flavonoïdes :

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3), la catéchine a été utilisée comme étalon. L'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 510 nm. Les résultats obtenus sont représentés dans une courbe d'étalonnage, ayant l'équation : $y = 0,333x$ $R^2 = 1$. La quantité des flavonoïdes a été rapportée en milligramme d'équivalent de la catéchine par 100 milligramme de poids sec de l'extrait (mg EC/ 100 mg Ps).

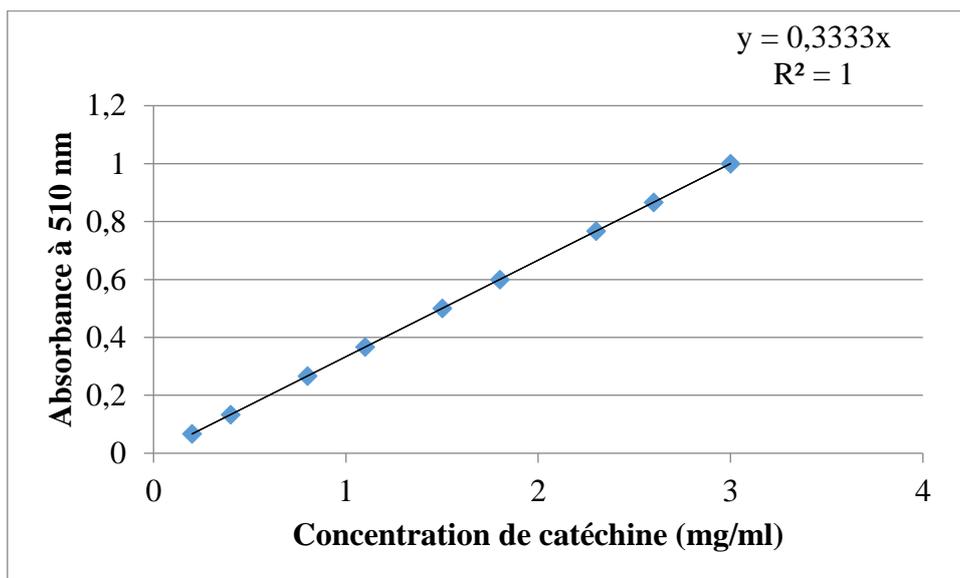


Figure 18 : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes totaux.

À partir de la courbe d'étalonnage, on peut estimer la teneur en flavonoïdes dans les deux extraits méthanolique et aqueux de *Prunus persica*. (Figure 19), et dans les extraits méthanoliques des feuilles et des racines de *Thapsia garganica* (Figure 20).

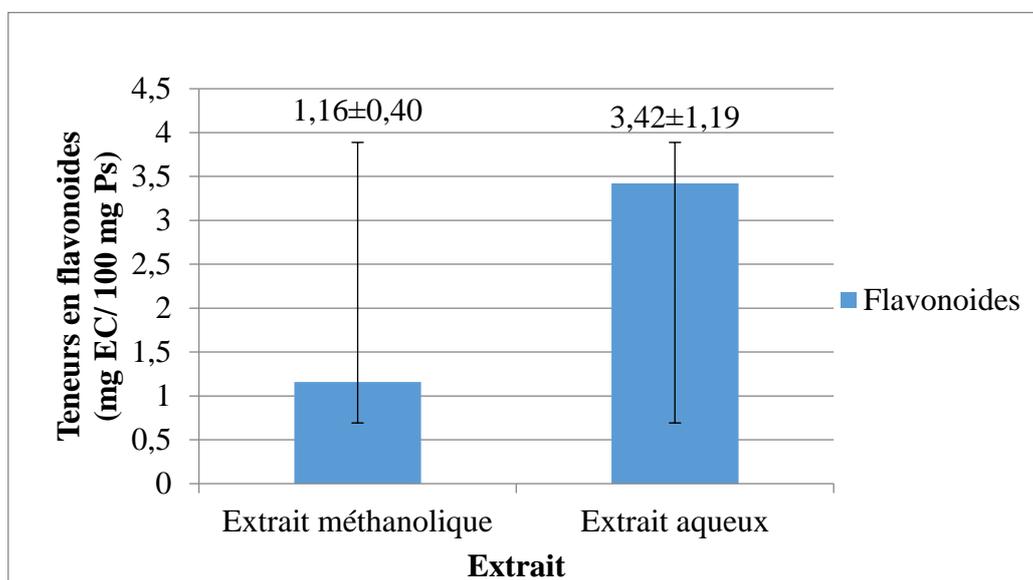


Figure 19 : Teneurs en flavonoïdes totaux des feuilles de *Prunus persica*.

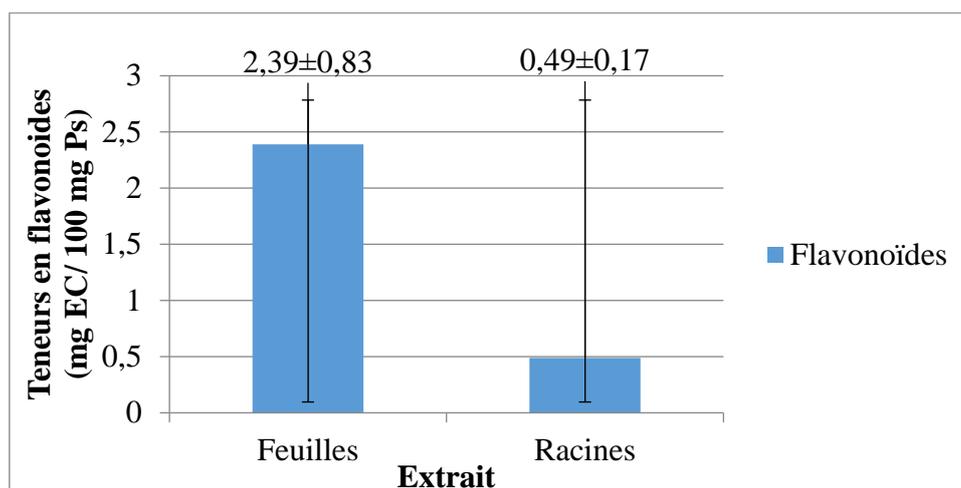


Figure 20 : Teneurs en flavonoïdes totaux *Thapsia garanica*.

VI.3. Résultats de dosage des tanins condensés :

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode à la catéchine en milieu acide (Price, M. L. *et al.*, 1978). Cette méthode est basée sur la capacité de la catéchine à réagir avec les unités des tanins condensés en présence d'acide pour produire un complexe coloré mesuré à 550 nm. Les résultats obtenus sont représentés dans une courbe d'étalonnage, ayant l'équation: $y = 0,333x$, $R^2 = 1$ La quantité des tanins condensés a été rapportée en milligramme d'équivalent de catéchine par milligramme de poids sec de l'extrait (mg EC/mg Ps).

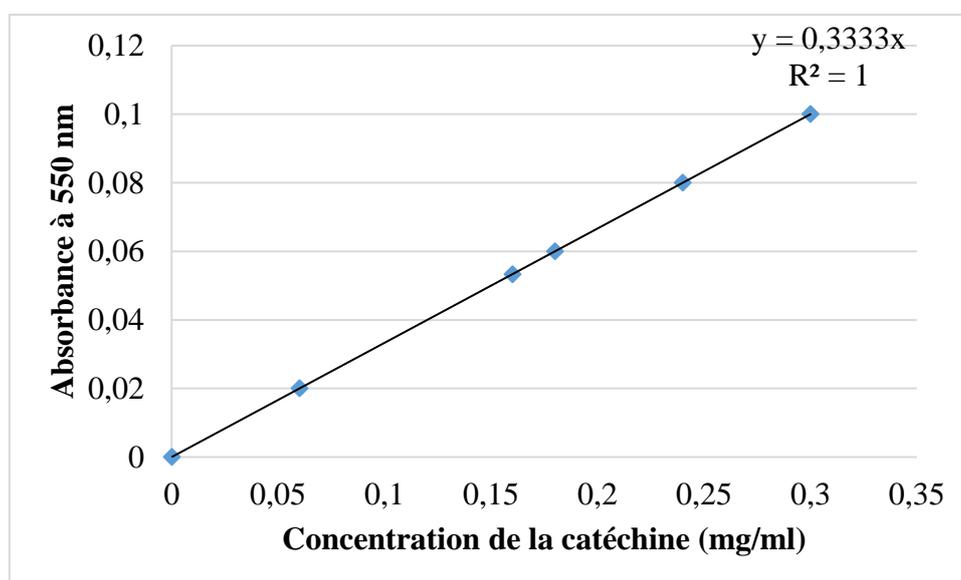


Figure 21 : Courbe d'étalonnage des tanins condensés des extraits de *Prunus persica*.

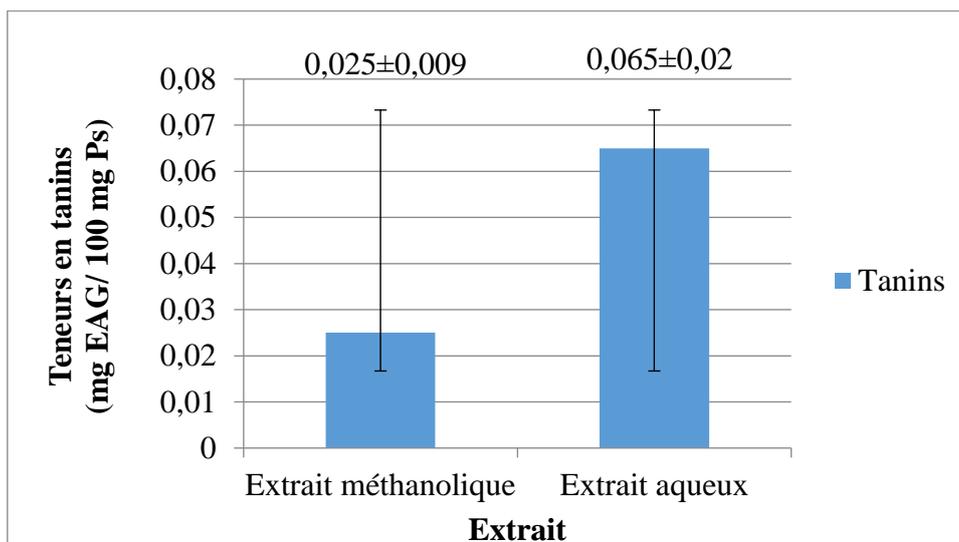


Figure 22 : Teneurs en tanins condensés des feuilles de *Prunus persica*.

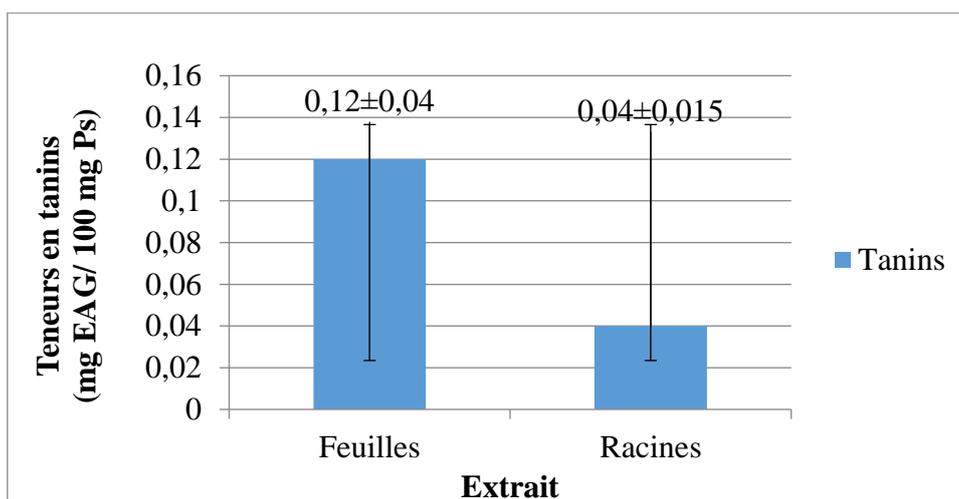


Figure 23 : Teneurs en tanins condensés de *Thapsia garganica*.

VII. Résultats de l'activité antioxydante :

VII.1. Piégeage de DPPH :

Les courbes illustrées dans les graphes suivants nous montrent que tous les extraits testés sont capables de neutraliser le radical DPPH• au cours du temps et en fonction de la concentration des antioxydants, ceci se traduit par la diminution de la concentration initiale de ce radical en comparaison avec les contrôles (l'acide ascorbique).

Les valeurs obtenues nous ont permis d'obtenir le graphe suivant :

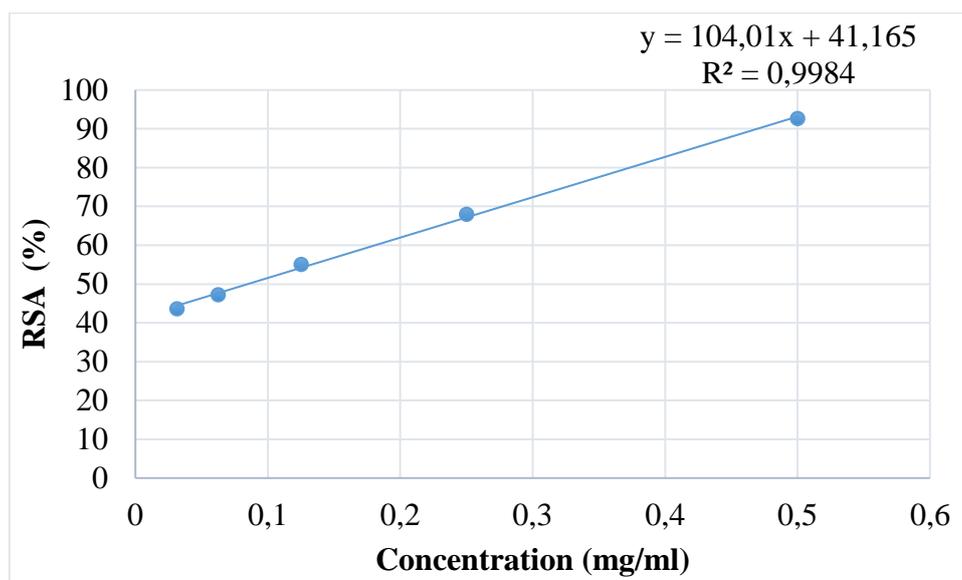


Figure 24 : Réduction de DPPH par l'acide ascorbique.

La valeur des CI_{50} de chaque extrait est déduite graphiquement par le tracé des courbes de variation du pourcentage d'inhibition RSA (%) (Annexe 05) en fonction de la concentration (mg / ml) de chaque extrait.

Les graphiques suivants récapitulent les CI_{50} obtenues pour tous les extraits des deux plantes TG et PP :

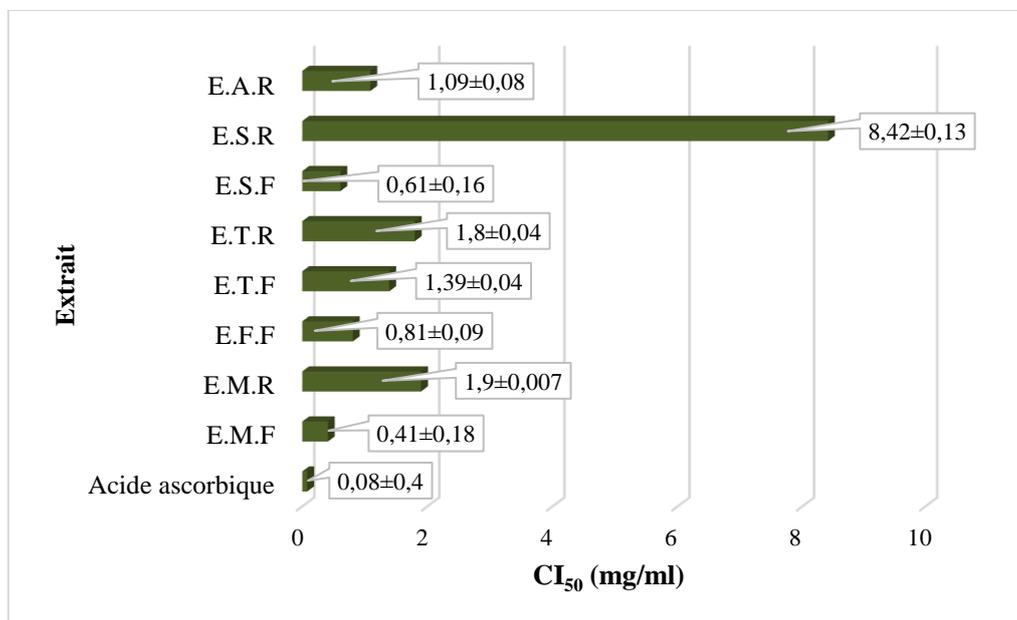


Figure 25 : CI_{50} des différents extraits de la plante *Thapsia garganica*.

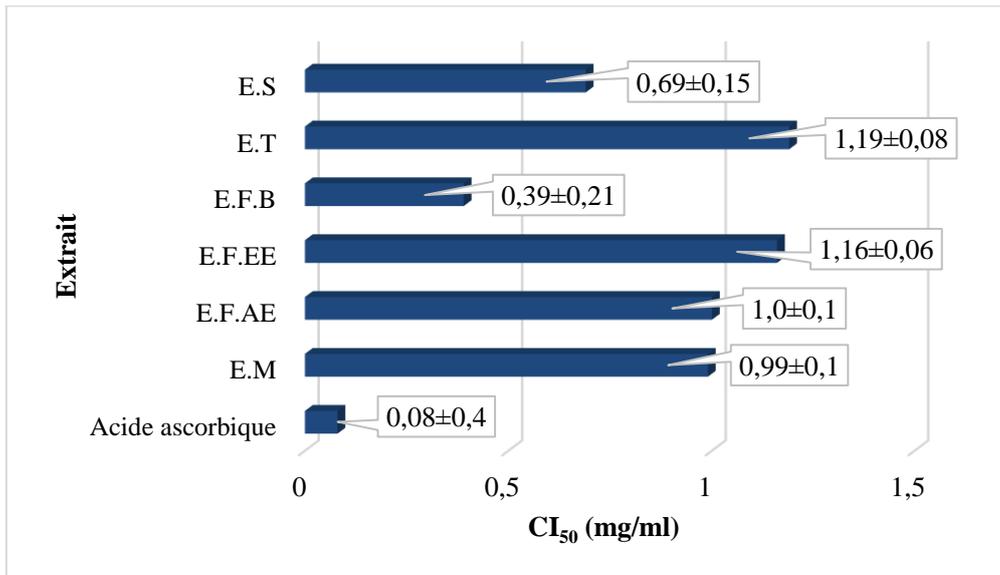


Figure 26 : CI₅₀ des différents extraits de la plante *Prunus persica*.

VII.2. Suivi cinétique de l'activité anti-radicalaire par le test au DPPH• :

Pour mener à bien l'évaluation de l'activité antioxydante des deux plantes étudiées, nous avons fait une étude cinétique des extraits suivants : fractions butanolique, acétate d'éthyle et étherée des flavonoïdes, méthanolique brute et tanins pour les deux plantes *Prunus persica* (feuilles) et *Thapsia garganica* (feuilles et racines). L'ensemble des résultats sont regroupés dans les graphes suivants :

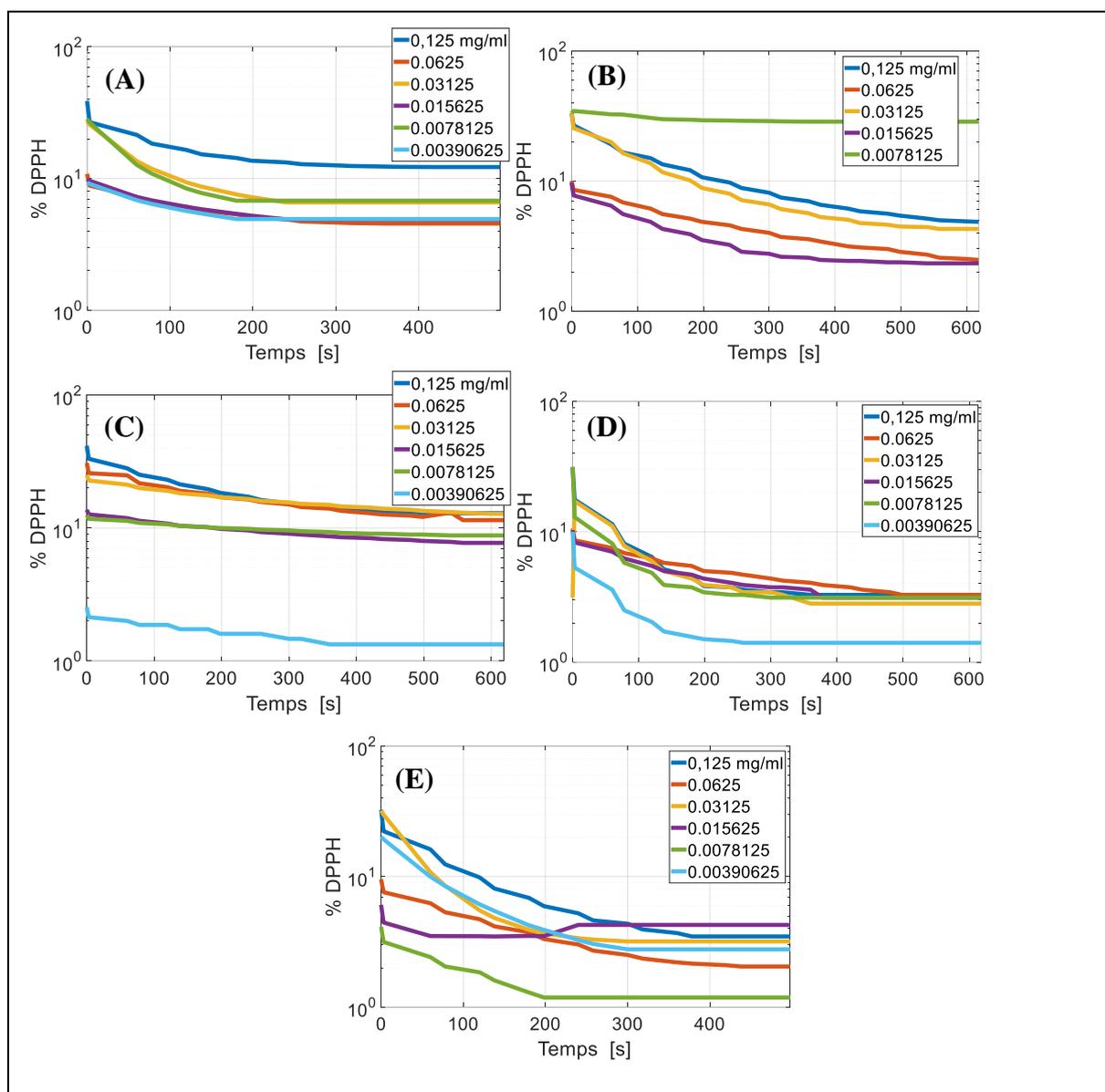


Figure 27 : Réduction de DPPH par les différents extraits de la plante PP (feuilles).
(A): Extrait méthanolique ; **(B) :** Extrait flavonoïdes acétate d'éthyle ; **(C) :** Extrait flavonoïdes éther di-étherique ; **(D) :** Extrait flavonoïdes butanolique ; **(E) :** Extrait tanins.

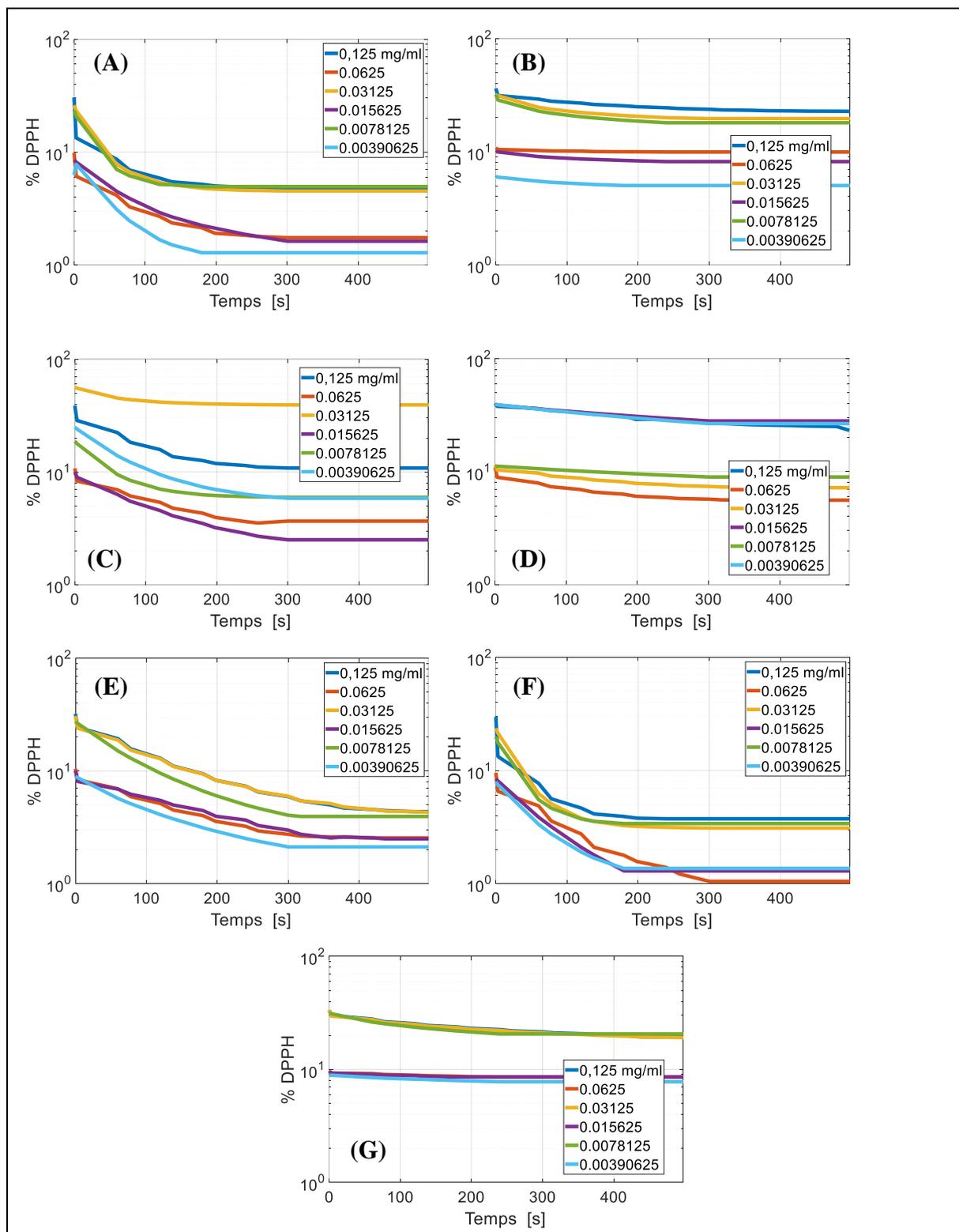


Figure 28 : Réduction de DPPH par les différents extraits de la plante TG (feuilles et racines).
(A): Extrait méthanolique F ; **(B) :** Extrait méthanolique R ; **(C) :** Extrait flavonoïdes acétate d'éthyle F ; **(D) :** Extrait flavonoïdes éther di-éthérique F ; **(E) :** Extrait flavonoïdes butanolique ; **(F) :** Extrait flavonoïdes butanolique F ; **(G) :** Extrait tannins F ; **(G) :** Extrait tannins R.

A partir des résultats précédents, les courbes expriment la réduction d'une solution de DPPH en fonction de temps, la réaction est exponentiel de type $Y=Y_0 + A \exp (R_0 \times X)$. On a remarqué expérimentalement, lorsqu'on additionne un volume défini de l'extrait à un volume déterminé de la solution DPPH, l'absorbance du mélange diminué vers une valeur très basse et stable. Ce résultat révéla que nos extraits ont un pouvoir antioxydant remarquable surtout que leurs $t_{1/2}$ prennent un temps très court pour les quatre concentrations. En plus, le pourcentage de DPPH restant varient entre 6,81 et 24,9 pour les différentes concentrations étudiées (Annexe N° 06).

Ces résultats justifient que les flavonoïdes restent une source majeure d'agents anti-radicalaires, cette cinétique variant selon l'extrait testé. Les paramètres caractéristiques de la cinétique de réduction de DPPH[•] pour les extraits testés sont regroupés dans le tableau 17 et tableau 18.

Parmi les extraits testés, l'extrait butanolique de la plante *Prunus persica* se trouve le plus actif par rapport aux autres extraits.

Tableau 17 : Coordonnées cinétiques de réduction du DPPH[•] (PP)

Extrait	CI ₅₀ (mg/ml)	PAR	T _{CE50} (min)	EAR	Classification
E.F.EE	1,16	0,86	8,35	0,010	Intermédiaire
E.F.AE	1,00	1	8,24	0,012	Intermédiaire
E.F.B	0,39	2,56	1,87	0,136	Rapide
E.T	1,19	0,84	5,99	0,014	Intermédiaire
E.M	0,99	1,01	5,54	0,018	Intermédiaire

Tableau 18 : Coordonnées cinétiques de réduction du DPPH[•] (TG)

Extrait	CI ₅₀ (mg/ml)	PAR	T _{CE50} (min)	EAR	Classification
E.F.AE	0,81	1,23	53,784	0,022	Lente
E.F.EE	0,8	1,25	53,12	0,023	Lente
E.F.B	0,69	1,44	44,16	0,032	Lente
E.T.F	1,39	0,71	44,48	0,016	Lente
E.T.R	1,8	0,55	119,52	0,004	Lente
E.M.F	0,81	1,23	32,4	0,038	Lente
E.M.R	0,41	2,43	27,224	0,089	Lente

VII.3. Résultat du test d'activité antioxydante (méthode de FRAP) :

La méthode de FRAP est basée sur la capacité des antioxydants à réduire le fer ferrique Fe^{3+} en Fer ferreux Fe^{2+} , alors que la puissance de réduction est l'un des mécanismes antioxydants (Karagözler, A. A. *et al.*, 2008).

Les résultats de l'activité réductrice des extraits méthanoliques des plantes étudiées sont représentés dans les figures 29 et 30. Nous constatons que la capacité réductrice est proportionnelle à l'augmentation de la concentration.

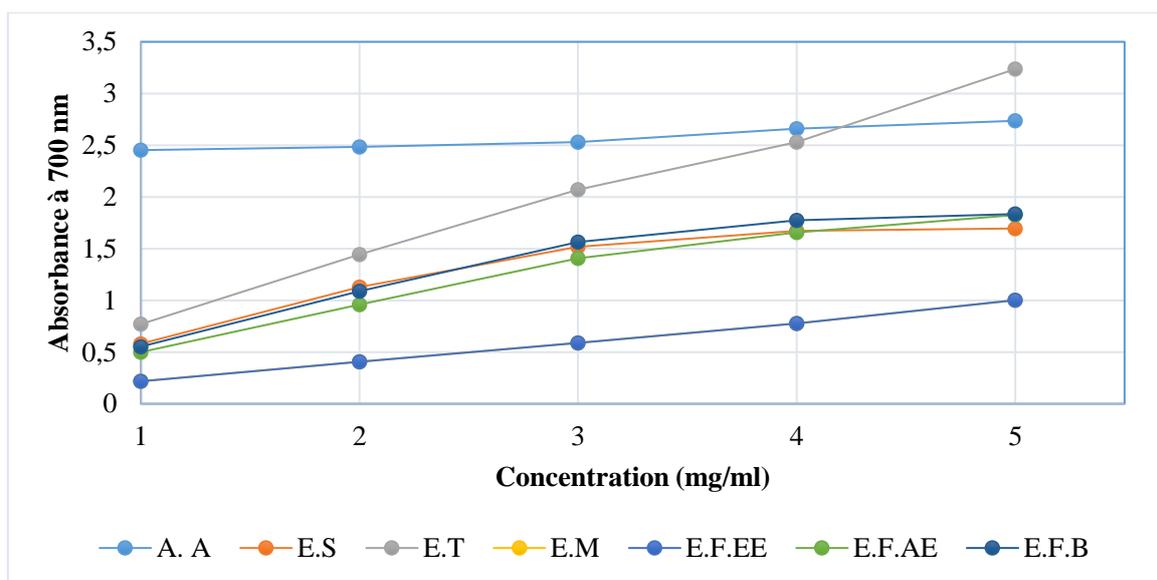


Figure 29 : Réduction de fer par les différents extraits de *Prunus persica*.

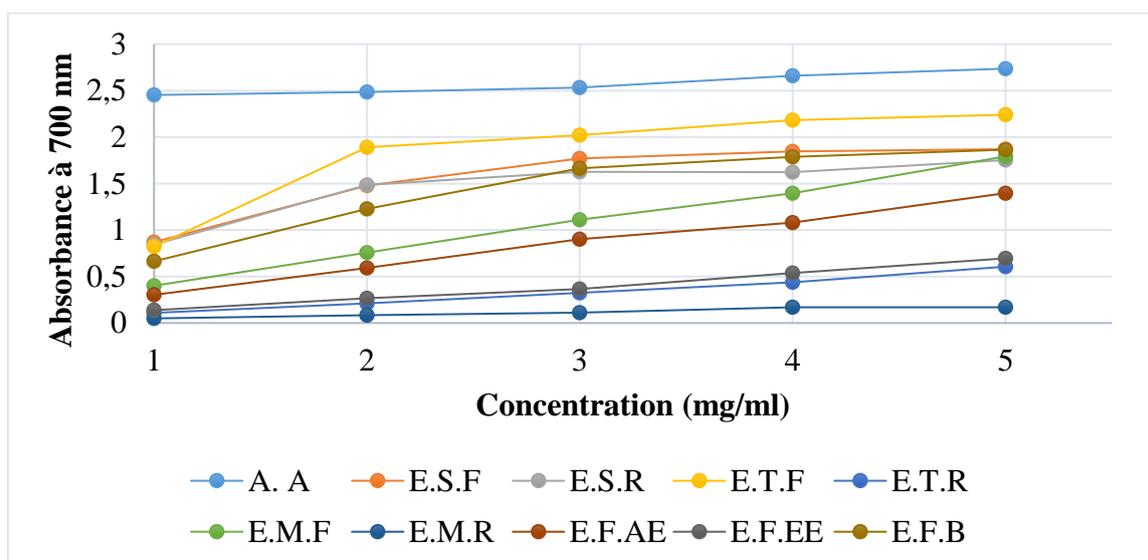


Figure 30 : Réduction de fer par les différents extraits de *Thapsia garganica*.

VIII. Résultats de l'activité antimicrobienne :

VIII.1. Résultats de l'activité antibactérienne :

Pour l'exploitation in vitro de l'activité antibactérienne, les extraits méthanolique brut des feuilles et des racines, Tanins feuilles et tanins racines, saponosides feuille et saponosides racines et les flavonoïdes de *Thapsia garganica* L ont été évalués contre un ensemble des bactéries pathogènes (*salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumonia*, *Citrobacter freundii* et *Enterococcus faecalis*).

Les résultats des tests de confirmation des souches bactériennes utilisées sont détaillés à l'annexe N° 07.

Les résultats du test microbien des extraits par la méthode des disques sont regroupés dans les figures 31 à 36. Le diamètre des zones d'inhibition se diffère selon la sensibilité et /ou la résistance de chaque souche bactérienne aux substances qui compose cette plante et la concentration de ces substances.

Les résultats d'activités aromatoigramme réalisées par la méthode de diffusion sur disque sont évaluée par mesure des zones d'inhibitions autour des disques et peut être symbolise par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis de l'extrait. Sachant que :

- Non sensible ou résistance : diamètre < 8mm.
- Sensible : diamètre comprise entre 9mm à 14mm.
- Très sensible diamètre comprise entre 15mm à 19mm.
- Extrêmement sensible : diamètre >20mm (**Ponce et al., 2003**).

La méthode des disques a donné des résultats plus ou moins importants pour les extraits .Au regard de ces résultats, nous avons observé que ces extraits exercent une activité antibactérienne dose dépendante.

Thapsia garganica :

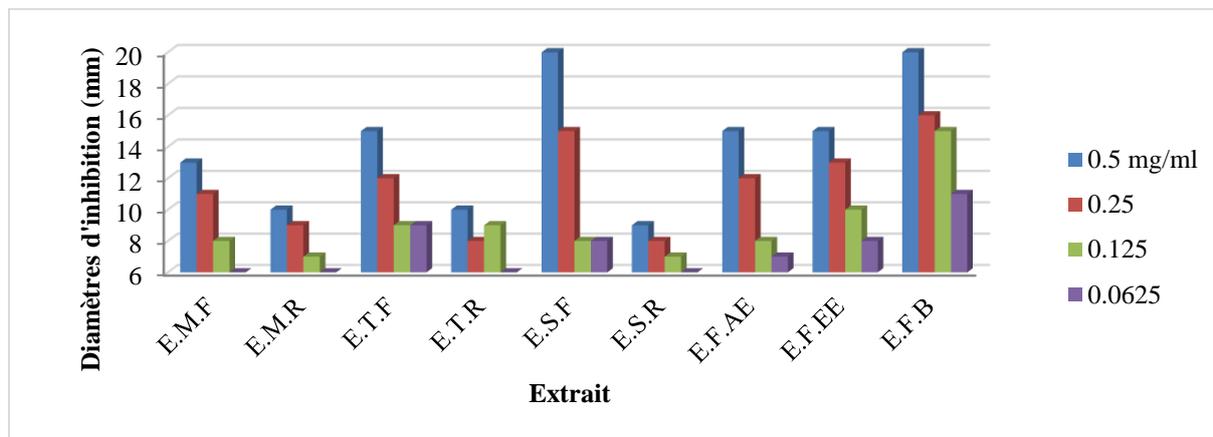


Figure 31 : Résultats de l'activité antibactérienne des extraits sélectifs de *Thapsia garganica* contre *P. aeruginosa*.

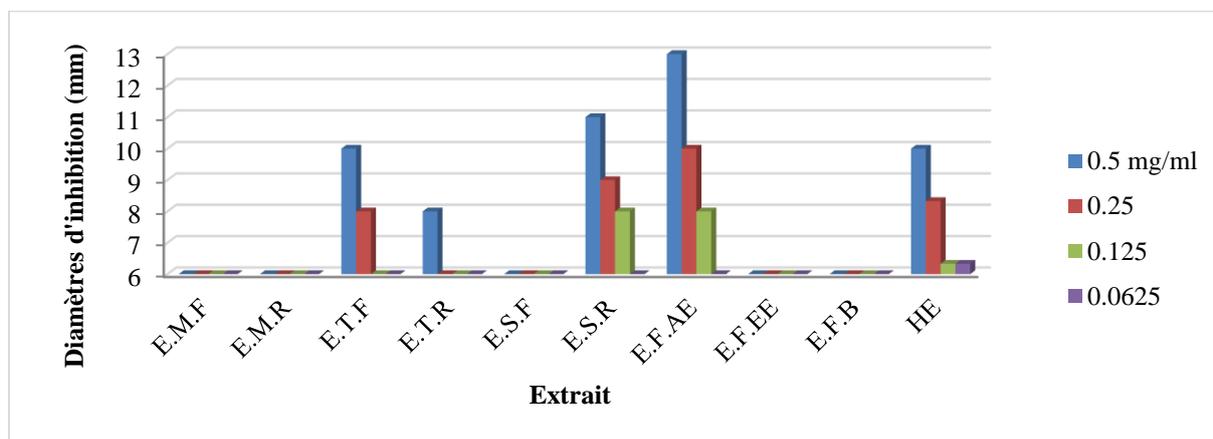


Figure 32 : Résultats de l'activité antibactérienne des extraits sélectifs de *Thapsia garganica* contre *Bacillus cereus*.

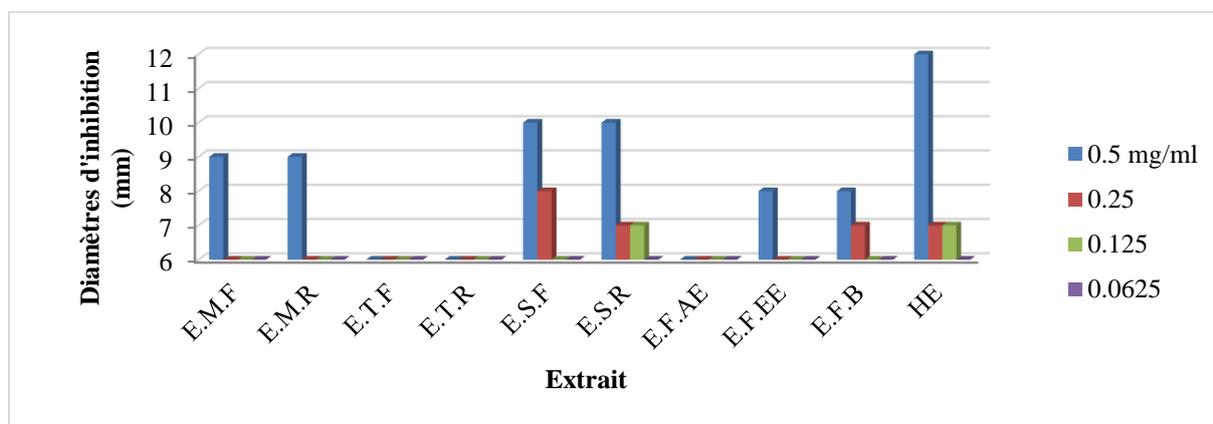


Figure 33 : Résultats de l'activité antibactérienne des extraits sélectifs de *Thapsia garganica* contre *Enterococcus faecalis*.

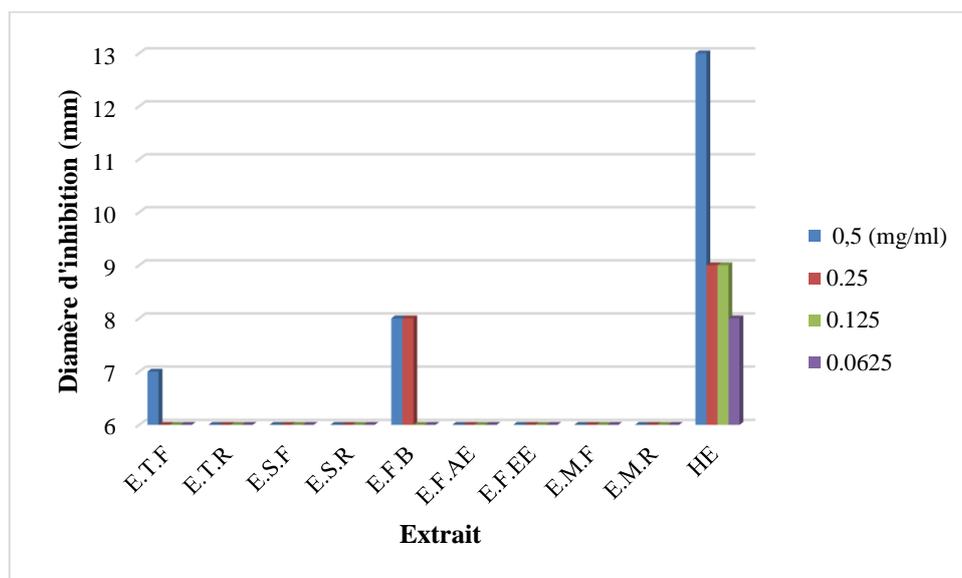


Figure 34 : Résultats de l'activité antibactérienne des extraits sélectifs de *Thapsia garganica* contre *Staphylococcus aureus*.

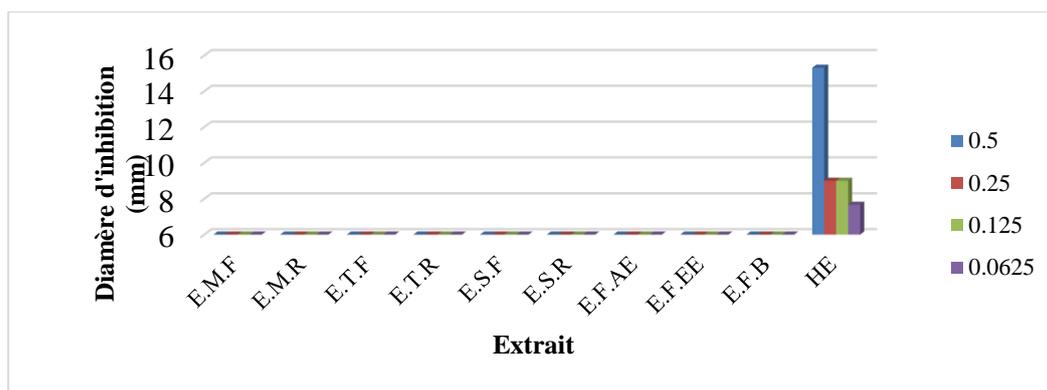


Figure 35 : Résultats de l'activité antibactérienne des extraits sélectifs de *Thapsia garganica* contre *Salmonella typhi*.



Figure 36 : Résultats de l'activité antibactérienne des extraits sélectifs de *Thapsia garganica* contre *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli*.

VIII.2. Test des antibiotiques :

Le test des antibiotiques a enregistré des différents résultats. Dans ce test on a utilisé six types des antibiotiques appliqués sur deux souches bactériennes identifiées telle qu'*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.

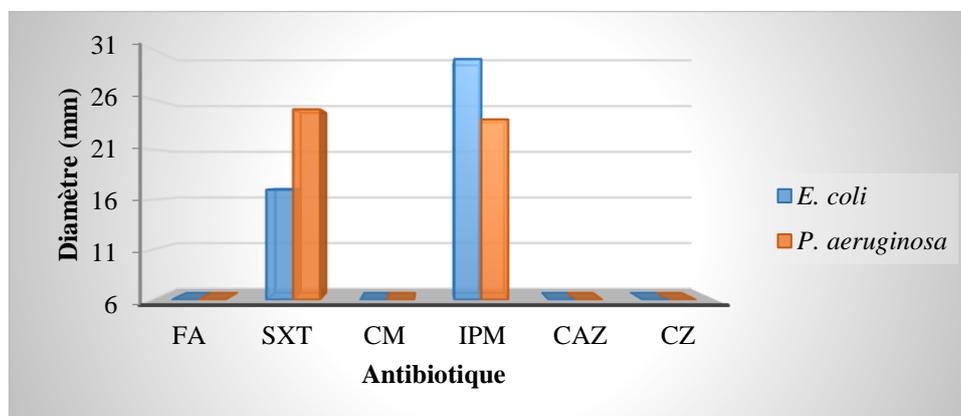


Figure 37 : Résultats de test d'antibiotique contre *E. coli* et *P. aeruginosa*.

VIII.3. Résultats de l'activité antifongique :

Dans ce travail, l'activité antifongique des différents extraits sélectifs de *Thapsia garganica* et *Prunus persica* a été effectuée sur deux souches fongiques qui ont été isolés et identifiés dans le laboratoire de microbiologie de l'université de Tahri Mohamed Bechar.

Les deux souches fongiques utilisées dans cette étude sont le *Penicillium purpurogenum* et l'*Aspargillus flavus*. Les extraits de deux plantes ont été partagés sur quatre concentrations différentes (0.5, 0.25, 0.125 et 0.0625 g/ml). La lecture des résultats s'effectue après sept jours d'incubation dans un incubateur de 25°C.

Les témoins des deux souches fongiques ont enregistré un diamètre de 70 mm pour l'*Aspargillus flavus* et un diamètre de 35 mm pour le *Penicillium purpurogenum*.

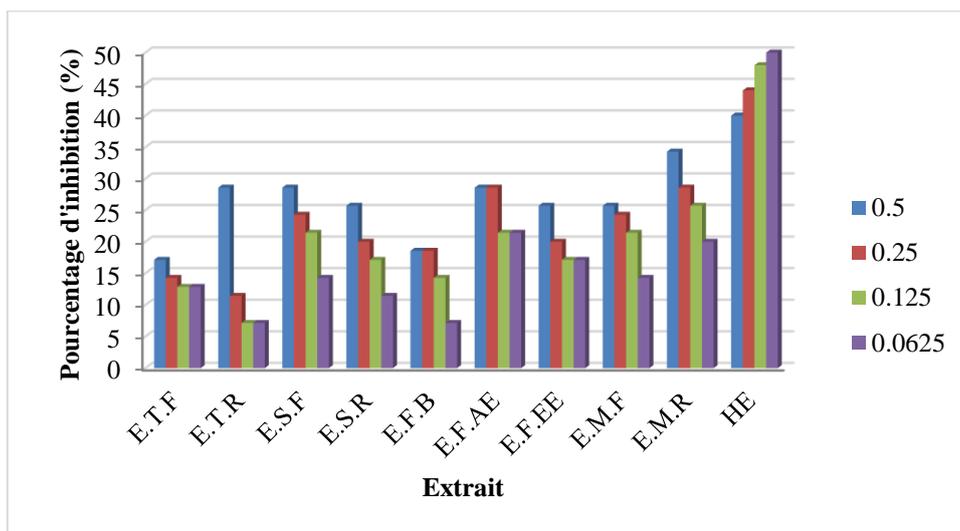


Figure 38 : Résultats de l'activité antifongique du les extraits de *Thapsia garganica* contre l'*Aspergillus flavus*.

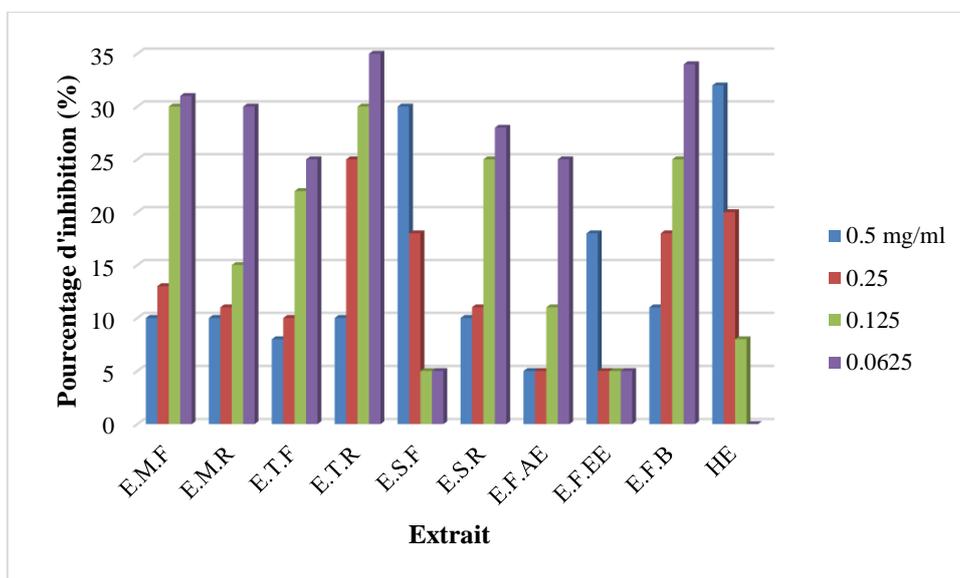


Figure 39 : Résultats de l'activité antifongique du les extraits de *Thapsia garganica* contre le *Penicillium purpurogenum*.

IX. Résultats de l'activité antibactérienne in-vivo :

Les résultats obtenus de l'activité antibactérienne in-vivo des différents extraits de TG sur la souche *Pseudomonas aeruginosa* sont regroupées dans les figures ci-dessous.

La figure 40 représente le suivie de la température des lapins après l'ensemencement de la souche *Pseudomonas aeruginosa* sur les plaies.

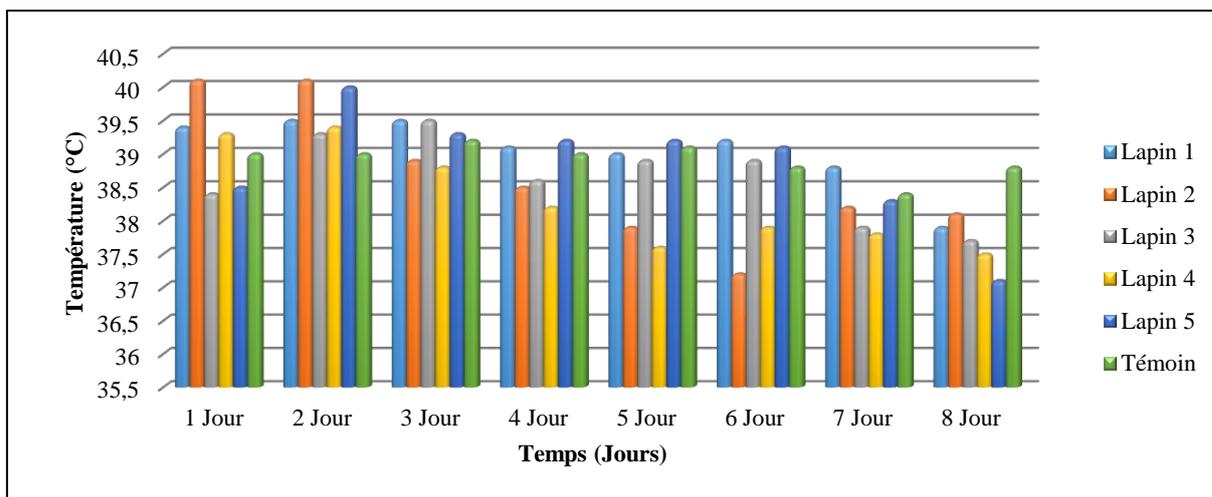


Figure 40 : Suivie de la température des lapins.

La figure 41 représente le dénombrement des colonies de la souche *Pseudomonas aeruginosa* après l'incubation de 24h pour chaque extrait.

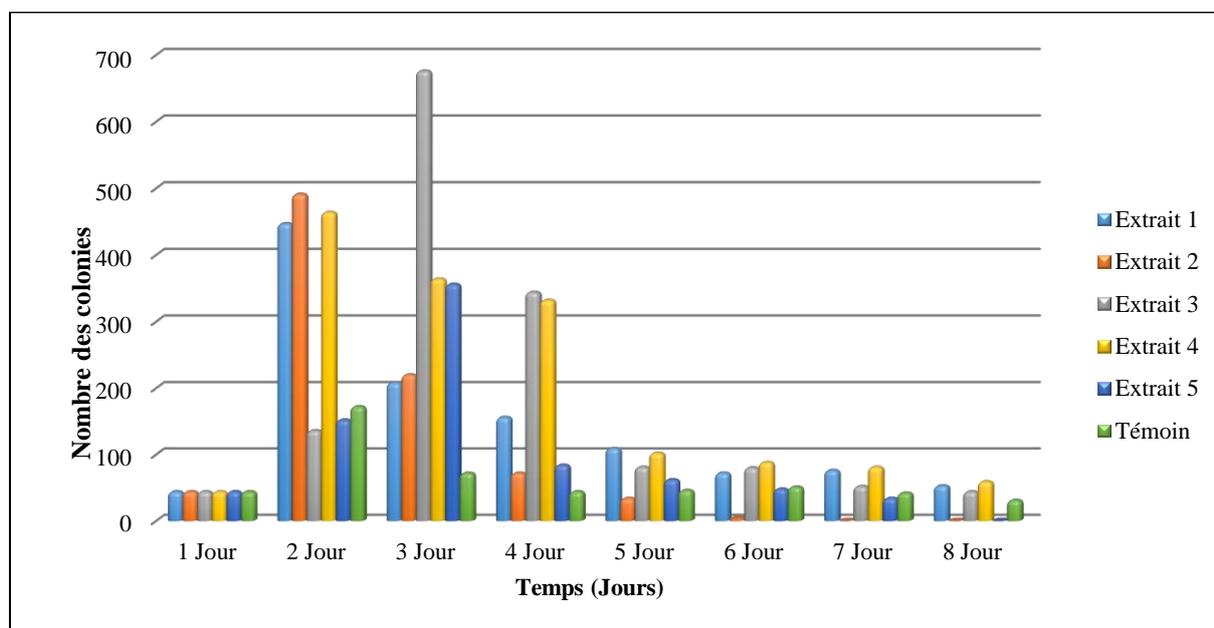


Figure 41 : Suivie de nombre des colonies.

La figure 42 et figure 43 représente les tailles de plaies en cm horizontale et verticale pour chaque lapin.

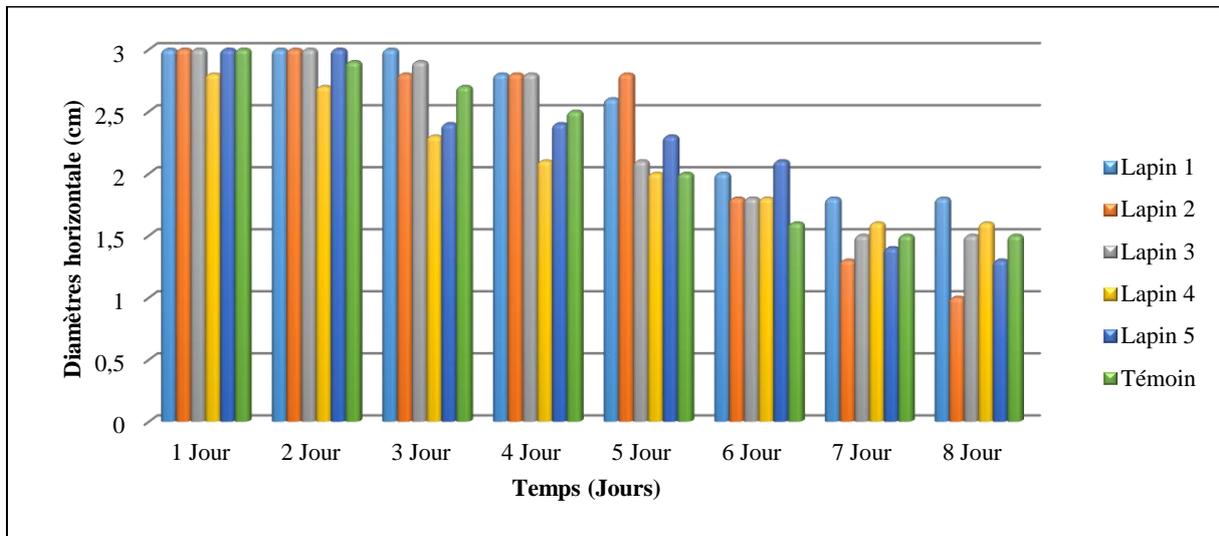


Figure 42 : Taille horizontale des plaies (cm).

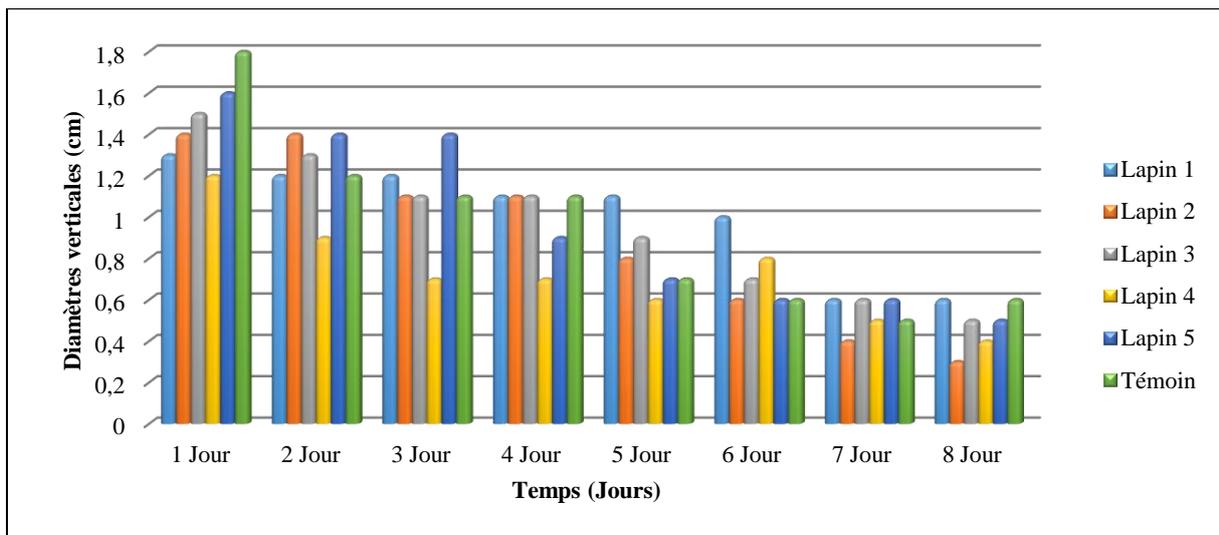


Figure 43 : Taille verticale des plaies (cm).



CHAPITRE 05

Discussions

Les résultats expérimentaux des tests phytochimiques (Annexe 01) réalisés sur les trois extraits (éthéré, méthanolique et aqueux) des feuilles de *Prunus persica* (L). montrent la présence des flavonoïdes, des tanins, des saponosides, des stérols et hétérosides stéroliques et des quinones libres. Par contre, ils montrent l'absence des emodoles, des composés réducteurs, des anthraquinones et des coumarines.

L'analyse des extraits dans la *Thapsia garganica* L. a permis de mettre en évidence l'absence de quelque métabolites secondaires dans les feuilles comme les alcaloïdes bases, les emodols, l'amidon, les anthracénosides, les anthocyanosides, les terpenoïdes, les coumarines, les quinones libres, les composés réducteurs. En revanche, les résultats montrent la présence des saponosides, des flavonoïdes, des tanins, les stérols et triterpènes et les acides gras. Pour les racines, une absence totale a été observée pour les alcaloïdes bases, les emodols, les flavonoïdes et les anthocyanosides. Par contre, les tests montrent la présence des alcaloïdes sels, des coumarines, des tanins, et des stérols et triterpènes, des acides gras, des terpenoïdes, des quinones libres, des composés réducteurs et l'amidon.

Benkrief, R. et al. (1990) avaient signalé que la *Thapsia garganica* (L.) contient les alcaloïdes sels. Ces métabolites secondaires sont des précurseurs de drogues très utiles en thérapie clinique. D'autres constituants ont aussi détectés tel que les quinones libres et des acides gras.

Concernant les résultats des analyses physico-chimiques des huiles essentielles de TG, La densité est parmi les caractéristiques physiques généralement utilisée dans la classification d'huile essentielle ; la densité de notre huile essentielle est inférieure à celle d'eau ($1\text{kg}/\text{cm}^3$).

L'indice de réfraction de notre essence est 1.418. Un indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé. Pour certains auteurs (**Boukhatem et al., 2010**), le faible indice de réfraction de l'HE indique sa faible réfraction de la lumière ce qui pourrait favoriser son utilisation dans les produits cosmétiques.

Le pouvoir de rotation indique si l'huile est dextrogyre ou lévogyre, ce qui est un critère important pour connaître la pureté d'une huile est de -0.25 qui montrent que notre essence est lévogyre.

La composition des huiles essentielles sont sujettes à plusieurs facteurs de variabilité, facteurs externes et internes à la plante. Pour une espèce donnée la proportion des différents constituants d'une HE peut varier suivant les conditions de stockage, la température, l'humidité relative, la durée totale de l'insolation et le régime des vents exercent aussi une influence directe, surtout chez les espèces qui possèdent des structures histologiques de stockage

superficielle (ex. : poils sécréteurs des Lamiaceae). Lorsque la localisation est plus profonde la qualité est beaucoup plus constante. (Bruneton, 1999 ; Gyorgyi et al., 2006 ; Danute et al, 2004) ont constatés que la composition chimique de l'HE de *D. carota* récoltée dans des régions propres est différente de celle obtenue dans des régions polluées.

Les paramètres physico-chimiques comme les constantes chimiques, l'indice d'acide donne une idée sur le taux d'acides libres. Dans notre étude, cet indice demeure relativement moyen. Cela peut trouver une explication dans la dégradation de l'HE (hydrolyse des esters) durant sa conservation, ce qui est à terme préjudiciable. Inversement, un IA inférieur à 2 est une preuve de bonne conservation de l'essence (faible quantité d'acides libres). (Kanko C, et al., 2004).

L'indice de saponification de notre huile est de 14.025 mg KOH/g. L'indice de saponification peut nous renseigner sur la richesse d'une huile en acides gras à chaînes longues pour un poids donné de triglycérides, sur la qualité et la quantité des groupements carboxyliques liés, complexés ou présents dans les substances susceptibles de former un savon avec une base après hydrolyse. Cet indice dépend des poids moléculaires des acides gras entrant dans la constitution des triglycérides du mélange. Plus les molécules d'acides gras contiennent d'atomes de carbone, moins l'indice de saponification est élevé (Karleskin G, 1992).

Concernant l'indice d'ester on a obtenu 11.80 mg KOH/g (Tableau 13) qui indique que l'hydrolyse des esters présents dans l'HE se fait par chauffage, dans des conditions définies.

La valeur d'indice de peroxyde de notre huile est en accord aux normes de codex alimentaires qui fixe une valeur inférieure à 10 Meq d'O₂/Kg d'huile (Codex Alimentarius, 2009). Dans le cas de notre essence, l'indice de peroxyde est très basse (1meq d'O₂/g) (Tableau 13). Cette oxydation est probablement due aux conditions d'extraction et de conservation qui peuvent provoquer une oxydation des acides gras insaturés entraînant ainsi leur diminution. Ce constat a été confirmé par les travaux de Ghedira (2006) où l'indice déterminé est de 65 Meq d'O₂/Kg.

Selon l'hypothèse d'Appelbaum, M., et al. (1989) l'oxydation d'huile peut aussi due aux d'autres substances présentes dans les huile telle que les caroténoïdes ; les vitamines A et E qui peuvent subir des réactions d'oxydation induire un indice de peroxyde élevé.

L'analyse effectuée par CCM sur les différents extraits de deux plantes décèle la présence de plusieurs spots. Ce qui montre que les extraits obtenus sont de composition très complexe.

Discussions

Il est à noter que beaucoup de difficultés ont été rencontrés lors du choix de l'éluant dans la séparation des flavonoïdes et des tannins, ce souci est expliqué par le fait que ces composés possèdent plusieurs OH qui sont très polaires. Le meilleur système utilisé est : l'acétate d'éthyle / MeOH pour les extraits éther di-éthyrique des deux plantes, et Toluène / MeOH / EtOH pour les extraits de acétate d'éthyle.

L'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle issue des feuilles de *Thapsia garganica* a permis d'identifier 50 composés. Ces 50 composés ont une aire cumulée qui correspond 96,63 % des aires cumulées de l'ensemble des constituants de l'huile essentielle. De façon générale, l'analyse de la composition chimique des huiles essentielles des feuilles de *Thapsia garganica* a montré une prédominance en monoterpènes oxygénés (42,27%). Les sesquiterpènes oxygénés et hydrocarbonés sont respectivement présents à 1,97% et 1,71%, les monoterpènes hydrocarbonés sont très minoritaire, à 0,81% et les autres composés sont à 49,87% (Tableau 17). Les constituants (+)-3-carene, 10-acetylmethyl (25,69%), l'alcool furfurylique (10,96%), le furfural (7,69%), Ethanone, 1-(1H-pyrrol-2-yl) (6,49%), L'acide heptanoïque (6,17%), l'Eugenol (4,24%) et Butyrovanillone (2,57%) composent les composés majoritaires de l'huile essentielle des feuilles de *T. garganica*.

Tableau 19 : Constituants majoritaires issus des huiles essentielles de la plante *Thapsia garganica* en comparaison avec la littérature.

Constituants	Pourcentage	Partie étudiée	Référence
p-vinylguaiacol	61,61%	Fleurs Feuilles Tiges	Ladjel, S., <i>et al.</i> , (2011)
Linalool	6,47%		
1,4-diméthylazulène	6,31%		
Limonène	5,15%		
Geraniol	1,17%		
p-vinylguaiacol	48,0% 61,3%	Fleurs Fruits	Avato, P. (1991)
Linalol	11,6 % 8,6)	Fleurs Fruits	
Géraniol	3,1 % 4,2%	Fleurs Fruits	
Chamazulène	58,3 % 49,2 %	Fleurs Feuilles	Casiglia, S., <i>et al.</i> , (2016)
Myristicine	15,07 %	Racines	Hachem, K., <i>et al.</i> , (2017)
Thuyone	14,86 %		
Elémicine	13,06 %		

Discussions

Bicyclogermacrène	/	Racines	Hassen, I., <i>et al.</i> , (2015)
Les guaianolides	/	/	Andersen, T. B., <i>et al.</i> , (2015)

En ce qui concerne les résultats des analyses spectroscopiques par RMN, Le composé PPAE4 se présente sous forme d'un solide jaune, soluble dans le méthanol. Ce composé est obtenu de la fraction acétate d'éthyle de l'extrait flavonoïdes des feuilles de *Prunus persica* L.

Le spectre RMN ¹H de composé PPAE4 (figure 13) présente un massif de protons résonant entre 7,30 à 7,42 ppm correspondant aux protons aromatiques. Un signal singulet à 7,19 ppm attribué à H-2' (cycle B du squelette flavonoïde). Il montre aussi à champ très faible, deux signaux résonants sous forme de doublet à 6,03 et 4,83 ppm, correspondant respectivement à H-1', 3', 5', 6' ou H-6, et H-8 ou H-1'' (glucose). Il présente également à champ fort trois signaux singulet attribuables aux protons d'un sucre de type Rhamnose résonant à δ 3,25 ; 3,08 ; et 2,47 ppm. La valeur du déplacement chimique d'un signal triplet résonant à 2,18 ppm attribué au solvant DMSO. Il montre un faible signal sous forme de multiplet à 2,01 ppm correspondant au H-3. Les valeurs des déplacements d'un signal singulet à 1,47 et 1,23 ppm sont attribuées aux groupements méthyles de sucre Rhamnose. Et deux signaux sous forme de multiplet à 1,17 et 0,93 ppm correspondant respectivement au H-13 d'un groupement hexyl et H-6''' de sucre Rhamnose.

Tableau 20 : Les déplacements chimiques (¹H, ¹³C) et les corrélations dans la littérature.

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité (J Hz)	Attribution	Partie étudiée	Référence
7,48 et 7,57	/	/	cycle benzénique monosubstitué		Kant, R., <i>et al.</i> , (2018)
6,03	/	s	proton méthine contenant de l'oxygène		
3,09	/	s	groupe méthoxy aromatique en position C-6		
1,27	/	s	groupe méthyle du rhamnose		
4,07-4,92	1H	m	multiplet de sucre	Ecorce	Raturi, R., <i>et al.</i> , 2011

Discussions

73,5			C-2'(glycone)		
3,07- 3,60	/	/	protons de sucre	Feuilles Ecorce des tiges	Backheet, E. Y., et al., (2003
7,35	3H	m	H-3, 4, 5		
7,45	2H	m	H-2, 6		
73,47	/	d	C-2'		
127,81	/	d	C-2,6		
128,14	/	d	C-4		
128,16	/	d	C-3 5		
73,13	/	/	C-2''		
73,73	/	d	C-2'		
3,3 et 3,9			glucose		
4,25-4,35			Le proton du rhamnose C-1		
0,8-0,95			méthyle		
1,2		d	le groupe méthyle		

Finalement, l'élucidation de la structure chimique définitive de composé PPAE4 nécessite d'autres techniques d'analyses spectroscopiques tels que : la RMN 2D et la spectroscopie de masse. Et même la faible quantité de l'extrait utilisée au cours des analyses RMN reste la première contrainte dans l'interprétation des spectres RMN.

Les teneurs en phénols totaux dans les extraits méthanolique et aqueux de la plante PP ont été déterminées par la méthode au réactif de Folin-Ciocalteu. Selon les résultats mentionnés dans la figure 18, les teneurs en phénols totaux varient entre $2,54 \pm 0,88$ et $1,14 \pm 0,39$ mg d'acide gallique /100ml pour l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux, respectivement.

Selon la figure 17, le taux des flavonoïdes des feuilles de *P. persica* est de $1,16 \pm 0,40$ mg/100g pour l'extrait méthanolique, alors que pour l'extrait aqueux, il est de $3.42 \pm 1,19$ mg/100g.

L'analyse des résultats de la teneur en tanins condensés dans les feuilles de PP consigné dans la figure 24 révèle que l'extrait aqueux est plus efficace pour l'extraction des tanins ($0.065 \pm 0,02$ mg EC/g Ps) que l'extraction par le méthanol ($0.025 \pm 0,009$ mg EC /g Ps).

Discussions

Tableau 21 : Comparaison des teneurs en polyphénols de la plante *Prunus persica* avec la littérature.

Phénols totaux (Eq AG/100g PS)	Flavonoïdes totaux (Eq C/100g PS)	Tanins condensés (Eq AG/100g PS)	Extrait	Partie étudiée	Référence
238.7 ± 5.44	/	/	Ethanolique	/	Yi, H. S. <i>et al.</i> 2008
217.0 ± 4.66	/	/	Aqueux		
< à 0.05 et à 0.0001 µg	/	/	Différents extraits		Gasparotto, J. <i>et al.</i> , 2014
/	60,14 et 1030,06 70,85 et 374,30	/	/	Pelures Pulpes	Zhao, X. <i>et al.</i> , (2015)
50,09	15,0	/	/	/	Ribarova, F., & Atanassova, M. (2005)
/	599,7–785,5 301,3–499,7	/	/	Pelures Pulpes	Manzoor, M. <i>et al.</i> (2012)
/	/	41,8±19,49	/	Feuilles	Fellah, K., <i>et al.</i> (2019)

Andreotti, C. *et al.*, (2008) ont mentionné que les quantités moyennes des acides phénoliques étaient d'environ 25 mg/g⁻¹ de matière sèche dans 60 jours après la floraison complète, et ont diminué à 3 mg/g⁻¹ de matière sèche lors de la maturation dans le tissu pulpeux. D'une autre part, **Noratto, G. *et al.*, 2009** ont trouvés que les polyphénols de pêche peuvent inhibés la croissance de tumeur et le métastase des poumons par un taux de 0, 8 – 1,6 mg/jour.

Par contre les résultats de teneurs en polyphénols des extraits de la plante TG montrent un taux égal à 2.21 ± 0,77 mg d'acide gallique/100ml dans les feuilles, et un taux égal à 1.63±0,56 mg d'acide gallique/100ml dans les racines.

Dans l'autre côté, l'extrait méthanolique des feuilles de TG possède une teneur en tanins condensé (0,12 ± 0,04 mg EC/ g Ps) supérieur de l'extrait méthanolique des racines (0,04 ± 0,015 mg EC / g Ps).

Discussions

Tableau 22 : Comparaison des teneurs en polyphénols de la plante *Thapsia garganica* avec la littérature.

Phénols totaux (Eq AG/100g PS)	Flavonoïdes totaux (Eq C/100g PS)	Tanins condensés (Eq AG/100g PS)		Partié étudiée	Référence
214,91 ± 2,33	7,52 ± 0,12			Racines	Yasmine, B., (2011)
191,74 ± 1,03	11,31 ± 0,11			Feuilles	
	15,25 ± 0,37			Fleurs	
7,63 et 2,50	52,94%			Partie aérienne	Djeridane, A. <i>et al.</i> , (2006, 2007)
47.64±1.43				Feuilles	Rached <i>et al.</i> , (2010)
		4,73 ± 0,22	Acétate d'éthyle		Athmouni, K., <i>et al.</i> (2015)
		3,74 ± 0,25	Aqueux		
		2,24 ± 0,17	Méthanolique		
		2,24 ± 0,17	Hexanoïque		
		0.62–131		Grains	Tlili, N. <i>et al.</i> (2015)

En comparant les teneurs en flavonoïdes à celles des composés phénoliques dans tous les extraits, nous remarquons qu'elles sont toutes plus faibles, ce qui indique que les extraits contiennent d'autres composés phénoliques possédant d'autres structures chimiques que celles des flavonoïdes (acides phénoliques, tanins...).

Les teneurs en tanins peuvent être influencés par plusieurs paramètres, tels que l'augmentation de la température qui favorise d'une part la diffusion et la solubilité des substances extraites, d'autre part elle détruit certaines substances fragiles (**Jokic, S. *et al.*, 2010**). Cette augmentation des teneurs en tanins condensés dans les décoctés peut être expliquée par la destruction par la chaleur des polyphénols oxydases (PPO) qui baissent la teneur en

polyphénols ; ainsi, la rupture de liaisons entre les polyphénols et d'autres substances (protéines, polysaccharides...) (Lutz, M. *et al.*, 2011). Notant aussi, que quel que soit le mode d'extraction, l'eau enregistre les teneurs les plus élevées en tanins condensés. En revanche, le méthanol extrait faiblement les tanins, mais le problème selon (Barahona Rosales, R. (1999) et (Jokic, S. *et al.*, 2010) est que l'eau, spécialement à hautes températures, extrait aussi des substances indésirables comme les protéines, les lipides et les colorants non phénoliques qui causent des interférences lors de dosage des tanins. L'extraction des tanins condensés dépend de leur nature chimique, du solvant utilisé et des conditions opératoires (Chavan, U. D. *et al.*, 2001).

A propos des tests de l'activité antioxydante de nos extraits avec la technique du CCM ont démontré la présence d'un pouvoir antiradicalaire révélé par l'apparition d'une tâche jaune sur la plaque CCM pulvérisée avec le DPPH, ce qui signifie qu'il a eu piégeage des radicaux libres DPPH (test qualitatif). Après la confirmation du pouvoir antioxydant de nos extraits *via* la technique CCM, et dans le but d'approfondir notre étude sur cette activité, une évaluation par quantification spectrophotométrique a été effectuée sur les différents extraits avec l'utilisation de l'acide ascorbique comme étant contrôle positif.

Le graphe (figure 12) illustre la stabilité et linéarité de l'intervalle des solutions préparées de DPPH•. La courbe montre que la solution DPPH préparée avait une bonne stabilité (une droite avec un très bon coefficient de corrélation $R^2 = 0,99$). Les CI_{50} sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées. Il est à noter que le pouvoir antioxydant des différents extraits a été déterminé à partir des CI_{50} , c'est la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical DPPH. Plus la valeur d' CI_{50} est petite, plus l'activité de l'extrait testé est grande (Khoudali, S., *et al.*, 2014).

En comparaison à l'acide ascorbique qui a le meilleur pouvoir antioxydant avec ($CI_{50} = 0,12 \pm 0,40$ mg/ml), les résultats montrent que l'extrait méthanolique, l'extrait des saponosides, et l'extrait flavonoïdes des feuilles de *T. garganica* possèdent le meilleur pouvoir antiradicalaire avec des valeurs de CI_{50} égal à $0,41 \pm 0,15$; $0,61 \pm 0,16$; $0,81 \pm 0,09$ mg/ml, respectivement.

En revanche, l'extrait tanins (feuilles et racines) ($CI_{50} = 1,39 \pm 0,04$; $1,80 \pm 0,04$ mg/ml), l'extrait méthanolique ($CI_{50} = 1,90 \pm 0,007$ mg/ml), et l'extrait alcaloïdes ($CI_{50} = 8,42 \pm 0,13$ mg/ml) des racines de TG possèdent un pouvoir de piégeage de radical DPPH• très faible. Nos résultats sont presque similaires avec des travaux précédentes, où l'activité de piégeage la plus forte a été observée dans la fraction d'acétate d'éthyle suivie par l'extrait de méthanol, avec

des valeurs CI50 de $0,16 \pm 0,02$ et $0,24 \pm 0,04$ mg/ml d'extrait respectivement. Les extraits à l'hexane et à l'eau des feuilles de *T. garganica* ont la plus faible capacité de piégeage des radicaux DPPH• avec des valeurs CI50 de $0,27 \pm 0,06$ à $0,36 \pm 0,01$ mg/ml d'extrait respectivement (Athmouni, K. *et al.*, 2015). D'autres études faites par Yasmine, B. (2011), et Alghazeer, R., *et al.* (2012), ont montré que les extraits des feuilles et des fleurs présentent une meilleure activité réductrice que l'extrait des racines. En effet, Rached *et al.*, (2010) ont montré que les extraits des feuilles de *Thapsia garganica* L. ont exhibé une inhibition positive du radical DPPH. En citant aussi l'étude récente de Nebeg Halima (2020) qui a trouvé que les valeurs CI50 varient de ($0,05 \pm 0,00$ et $0,3 \pm 0,009$ mg/ml) pour les extraits de méthanol provenant des feuilles et des racines, respectivement. En sait préalablement que, les valeurs des CI50 étudiés par Naffati *et al.* (2017) des extraits aqueux (0,02 mg/ml) sont supérieurs à celles des extraits éthanoliques (0,024 mg/ml) de la partie aérienne de *Thapsia garganica*. Encore, les extraits méthanoliques de graines et feuilles étudiés par Tlili N., *et al.* (2015) ont des valeurs du CI50 proches de celles des extraits méthanoliques de graines de *Thapsia garganica* avec une valeur de 0,046 mg/ml.

Par ailleurs, si on compare nos résultats avec ceux des autres espèces de la même famille d'Apiaceae, les extraits des graines de *Thapsia garganica* ont des activités plus importantes que celles de graines d'anis et de coriandre (espèces majeures de cette famille), avec des CI50 de $0,687 \pm 0,028$ mg/ml et $1,930 \pm 0,024$ mg/ml respectivement (Martin, N. 2016).

À partir des résultats trouvées, on remarque que l'extrait butanolique de la plante *P. persica* a un pouvoir antioxydant supérieur avec une $CI_{50} = 0,39 \pm 0,21$ mg/ml, suivi par l'extrait des saponosides ($CI_{50} = 0,69 \pm 0,15$ mg/ml), l'extrait méthanolique ($CI_{50} = 0,99 \pm 0,10$ mg/ml), l'extrait d'acétate d'éthyle ($CI_{50} = 1,00 \pm 0,10$ mg/ml), l'extrait éthérique ($CI_{50} = 1,16 \pm 0,06$ mg/ml), alors que l'extrait des tanins révèle une faible activité antioxydante ($CI_{50} = 1,19 \pm 0,08$ mg/ml). La recherche réalisée par Dhingra, N., *et al.* (2014) est en accord avec nos résultats, ce qui est prouvé par les valeurs CI50 ($0,184 \pm 0,008$ et $1,008 \pm 0,004$ mg/ml) pour la fraction d'acétate d'éthyle et la fraction d'hexane, respectivement.

Notons aussi que Djenidi, H. (2020) qui a travaillé récemment sur l'extrait hydro-méthanolique des fruits de pêche ou elle a trouvé une valeur de $CI_{50} = 0,98 \pm 0,02$ mg/ml. D'autre étude effectuée par Mokrani, A., & Madani, K. (2016) ont prouvé que lorsque la température passe de 25°C à $37,5^{\circ}\text{C}$, le DPPH-RSA est réduit avec des pourcentages d'inhibition de 48% à 39%, respectivement.

Pour ce qui est du suivi cinétique, les figures (25 et 26) illustrent la variation de pourcentage de DPPH réduit par les différents extraits en fonction du temps. Des profils très identiques sont observés à des concentrations élevés. Quel que soit le type d'extrait étudié, une corrélation inversement proportionnelle entre le pourcentage de DPPH et le temps de la réaction. Les résultats révèlent que l'extrait des tanins de *Thapsia garganica* (feuilles) a un pouvoir antioxydant élevé pour un temps 121 secondes qui peut réduire le DPPH de 30 à 04% (0,625 mg/ml), alors qu'il est important de souligner que beaucoup de travaux décrits dans la littérature confirment bien que les tanins ont un bon pouvoir antioxydant très significatif (**Amadou, I., et al., 2011**). De même l'extrait brute méthanolique des (feuilles) de *Thapsia garganica* à un pouvoir antioxydant important avec une réduction de DPPH de 30 à 05% en durée de 130 secondes, ce qui est lié à leur contenu en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins. Alors que l'extrait butanolique des flavonoïdes (TG) révèle une fiable activité antioxydante avec réduction de DPPH de 30 à 04% avec un temps plus large vers 300 secondes. On trouve une bonne activité antioxydante de l'extrait butanolique des flavonoïdes (0,625 mg/ml) de *Prunus persica* en réduisant le taux de DPPH de 32% jusqu'à 03,5% au cours de 200 secondes, bien que l'extrait des tanins (0,156 mg/ml) de cette plante réduise le DPPH de 33% à 4% au cours de 185 secondes.

Pour les autres extraits, on constate une activité moyenne de réduire le DPPH qui nécessite plus du temps (réaction assez lente). IL est à signaler que très peu des travaux en matière de suivi cinétique de l'activité antioxydante des deux plantes étudiées sont affichés dans la littérature. Où **Fellah, K. et al., (2020)** on observons que l'augmentation de la concentration des extraits testés révèle une diminution proportionnelle avec le pourcentage résiduel du DPPH à un point où il y a presque la réduction totale de ce radical comme le cas de la fraction butanolique de *P. persica* L. avec 3.87% après 5.5 min.

L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode de FRAP a été développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}). En effet le Fe^{3+} participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm (**Oyaizu, 1986**), et les résultats obtenus sont dressés dans les figures 27 et 28.

Les résultats du pouvoir réducteur de nos extraits présentent un pouvoir réducteur du Fer assez important que l'acide ascorbique. Les résultats obtenus montrent que la capacité de réduire le fer par nos extraits est nettement supérieure à celle de l'acide ascorbique. Peu de données bibliographiques concernant l'activité antioxydante par la méthode de FRAP des plantes choisies sont disponibles. **Nebeg Halima (2020)** a trouvé des valeurs de CI50 égal à

0,18±0,01 mg/ml et 0,5±0,009 mg/ml pour les feuilles et les racines de *T. garganica*, respectivement. D'autre part, l'étude réalisée par **Athmouni, K., et al. (2015)** confirme que les feuilles de *T. garganica* ont montré une activité antioxydante plus élevée dans l'extrait d'acétate d'éthyle (1,21 ± 0,01 mg ET/g Ps) suivi par l'extrait de fraction éthanolique (1,08 ± 0,21 mg ET/g Ps), et la moindre quantité de piégeage FRAP a été observée dans l'extrait aqueux (0,48 ± 0,02 mg ET/g Ps) suivi par la fraction hexanoïque (0,74 ± 0,01 mg ET/g Ps). Rappelons aussi que **Jmii, G., et al., (2020)** ont mentionné que les activités les plus élevées ont été obtenues avec les racines traitées de TG (22,00 g/mL) et les feuilles traitées de TG (32,00 g/mL), contre 45,00 g/mL et 59,00 g/mL, enregistrées dans les témoins, respectivement. Concernant la plante *P. persica*, une valeur de CI50= 21,47±1.44 mg/ml a été trouvé par **Djenidi, H. (2020)**, et l'étude de **Mitic, V., Ilic, et al., (2016)** sur différents cultivars a conduit aux valeurs CI50 = 0.28 ± 0.02 à 1.15 ± 0.03 mmole Fe / g.

En conclusion, on peut conclure que ces résultats confirment bien que les flavonoïdes et les tanins restent une source importante d'agents anti-radicalaires.

En ce qui concerne l'activité antibactérienne de la plante TG, on a trouvé que la zone d'inhibition la plus élevée contre la souche *Pseudomonas aeruginosa* est celle des extraits des flavonoïdes (fraction n-butanol) et des saponosides (feuilles) avec un diamètre de 20 mm pour la concentration 0.5 g/ml, et un diamètre de 18 mm pour les flavonoïdes (fraction acétates d'éthyle et fraction éther diéthylique) pour la concentration 0.5 g/ml. Pour les *Bacillus cereus*, le diamètre d'inhibition est de l'ordre de 11 mm pour les extraits saponosides (racines) et flavonoïde éther diéthylique pour la concentration 0.5 g/ml. Par contre la concentration 0.25 g/ml a donné un diamètre de 08 mm. Un même diamètre pour l'extrait des tanins feuilles de concentration 0.5 g/ml et de concentration 0.25 g/ml, et la concentration 0.5 g/ml donne un diamètre de 10 mm. La concentration 0.25 g/ml de l'extrait des saponosides (feuilles) donne un diamètre de 09 mm. L'effet des extraits contre l'*Enterococcus faecalis* donne un diamètre de 10 mm pour la concentration 0.5 g/ml de saponosides (feuilles), et un diamètre de 09 mm pour la concentration de 0.5 g/ml de l'extrait méthanolique (feuilles) et l'extrait méthanolique (racines).

Un diamètre de 08 mm pour la concentration de 0.25 g/ml des saponosides (feuilles), et aussi pour la concentration 0.5 g/ml des extraits flavonoïdes n-butanol et flavonoïdes éther diéthylique. Un diamètre de 07 mm pour les concentrations 0.5 et 0.25 g/ml des saponosides (racines). Tandis que la souche *staphylocoques aureus* on a enregistré un faible effet dont le diamètre d'inhibition est de 08mm pour les concentrations 0.5 et 0.25 g/ml de l'extrait des saponosides (feuilles), et 07mm pour la concentration 0.5g/ml de l'extrait méthanolique

(feuilles). Pour les souches *Salmonella*, *Escherichia coli* et *K. pneumoniae* ont révélées une grande résistance contre les différents extraits étudiés de *Thapsia garganica*.

Les résultats du test d'aromatogramme ont montré une réduction de croissance basse à la concentration 0.5; 0.25; 0.125 mg/ml de l'huile essentielle de TG vis-à-vis *Citrobacter freundii*; *Bacillus cereus* avec des zones d'inhibitions allant de 6mm à 9mm ; *Staphylococcus aureus*, *salmenella typhi*, *Enterococcus faecalis* ont été les bactéries les plus sensibles (zone d'inhibition ente 13mm à 15 mm) à la concentration de 1mg/ml de huile.

Comme il est rapporté dans la littérature nous considérons qu'une huile essentielle a une action bactériostatique si son diamètre d'inhibition est supérieur à 12 mm (Baudoux, D., et al., 2009; Sağdıç, O. , 2003) ou à 15mm (Rossi, P. G. , 2003).

Les bactéries à Gram (-) possèdent une forte résistance, cette résistance n'est pas surprenante, elle est en relation avec la nature de leurs membranes externes qui se compose des phospholipides, des protéines et des lipopolysaccharide ce qui rend cette membrane imperméable à la plupart des agents biocides (Fauchère, J. L., & Avril, J. L., 2002 ; Bouhdid, S. et al., 2006).

La résistance de ces bactéries n'est pas surprenante, en fait, ces bactéries possèdent une résistance intrinsèque aux agents biocides qui est en relation avec la nature de leurs membranes externes composées de lipopolysaccharides qui forment une barrière imperméable aux composés hydrophobes. En présence d'agents perméabilisant de la membrane externe, des substances inactives contre ces bactéries deviennent actives. Il cause la perforation de la membrane bactérienne par l'extrait et le flux rapide des composants cytosoliques (Thuille, N. et al., 2003).

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

De l'autre côté, les tests d'antibiogramme montrent que le plus grand effet apparié est pour IPM contre les souches bactérienne *E-coli* dont une zone de 30 mm de diamètre. L'analyse du profil de la résistance des souches d'*Escherichia coli* montre une augmentation des taux de résistance pour les pénicillines avec un pourcentage de 71.1% pour l'ampicilline, de 78.8% pour l'amoxicilline, de 80.8% pour la ticarcilline et de 53.8% pour la pipéracilline (Djahida, S. et al., 2011). Les quatre autres antibiotiques (FA, CM, CAZ et CZ) utilisés n'ont donné aucun

résultat contre les deux souches utilisées dans ce test. Nous rappelons que le comité de l'antibiogramme de l'SFM (Bonnet, R., *et al.*, 2013) a montré que la résistance naturelle est caractéristique d'une espèce bactérienne. Elle délimite le spectre naturel de l'antibiotique et constitue une aide à l'identification. La résistance naturelle se traduit habituellement par des CMI supérieures à la valeur critique basse de la concentration de l'antibiotique concerné.

Au sujet des résultats de l'activité antifongique de la plante TG, on constate que les deux souches fongiques utilisées dans cette étude sont le *Penicillium purpurogenum* et l'*Aspargillus flavus*. Les neufs extraits sélectifs de *Thapsia garganica* L utilisés sont : l'extrait brut méthanolique de feuilles et racines, les tanins de feuilles et racines, les saponosides de feuilles et racines et les flavonoïdes (n-butanol - acétates d'éthyles – éther d'éthylique). Chaque extrait est partagé en quatre concentrations différentes 0.5, 0.25, 0.125 et 0.0625 g/ml.

La lecture de ces résultats s'effectue après sept jours d'incubation dans un incubateur de 25°C. Les témoins des deux souches fongiques ont enregistré un diamètre de 70 mm pour l'*Aspargillus flavus* et un diamètre de 35 mm pour le *Penicillium purpurogenum*.

Généralement l'extrait le plus efficace contre l'*Aspargillus flavus* est l'extrait brut méthanolique des racines dont il limite la croissance de ce champignon dans les limites d'un maximum de 46 mm pour la concentration 0.5 g/ml par rapport aux autres extraits, suivie par les extraits des flavonoïdes acétates d'éthyle et saponosides feuilles avec un diamètre de 50mm pour la concentration 0.5 g/ml. Les extraits des tanins des feuilles ont les plus faibles pouvoir antifongique, où la zone de croissance est arrivée jusqu'à 58 mm pour la concentration 0.5 g/ml. Pendant que, l'extrait des flavonoïdes acétate d'éthyle est le meilleur inhibiteur en comparaison aux autres extraits de *Thapsia garganica* sur le *Penicillium purpurogenum* dont il a enregistré un diamètre de croissance qui n'a pas dépassé 05 mm pour les concentrations 0.5 et 0.25 g/ml. Ensuite, les tanins feuilles dans lesquels ces souches enregistrent un diamètre de croissance qui ne dépasse pas les 08 mm pour la concentration 0.5 g/ml. Contrairement aux tanins des racines qui ont un effet d'inhibition faible (10 mm de croissance) pour la concentration 0.5 g/ml, alors que la concentration de 0,0625 g/ml n'a marqué aucune efficacité (35 mm).

La lecture des diamètres de la croissance de nos souches sous l'effet des différentes concentrations d'huile de *Thapsia garganica* démontre une capacité de cette huile à réduire la croissance radiale mycélienne, après 5 jours d'incubation où l'on note une petite légère fluctuation de la croissance mycélienne à la concentration prélevé d'huile.

Généralement, il y a une forte inhibition de la croissance radiale sur le milieu solide contre le *Penicillium purpurogenum*, on a trouvé une meilleure inhibition par l'effet d'huile essentielle avec un diamètre de 8 mm pour la concentration 1 mg/ml et avec un diamètre de 30

Discussions

mm pour *Aspergillus flavus* pour la même concentration. Les meilleurs effets d'inhibition contre le *Penicillium purpurogenum* et *Aspergillus Flavus* sont à 32% et 60%, respectivement pour la concentration de 1 mg/ml.

Finalement, les tests préliminaires de l'activité antibactérienne in-vivo de nos extraits montrent un effet positif dans l'inhibition de la croissance de la souche *Pseudomonas aeruginosa* sur les plaies provoqués aux dos des lapins. En plus nos extraits montrent une diminution de la température des lapins très remarquable, et encore une bonne réduction des tailles des plaies dans une période de 07 jours. Dans notre expérience, l'extrait flavonoïdes éther di-éthérique est considéré comme un bon anti-Pseudomonas, suivie par l'extrait des tannins (feuilles) de la plante *Thapsia garganica* qui a donnée des bons résultats mais après une semaine.



Conclusion générale

Conclusion générale et perspectives

La connaissance et l'usage des plantes médicinales constituent un vrai patrimoine de l'être humain. Leur importance dans le domaine de la santé publique est très accentuée dans ces dernières années grâce aux thérapeutiques qu'elles procurent. Cette diversité en propriétés biologiques est liée certainement aux vertus thérapeutiques attribuées à une gamme extraordinaire de molécules bioactives synthétisées par la plante non seulement comme des agents chimiques contre les maladies, les herbivores et les prédateurs mais aussi comme des agents médicinaux tels que les antioxydants.

Les régions de Saida et Naâma sont riches en plantes aromatiques médicinales, l'importance de ces plantes a été observée grâce aux utilisations traditionnelles par les populations. Mais tenant compte des facteurs climatiques, de l'environnement, socio-économiques certains espèces deviennent de plus en plus rares et d'autres demeurent abondantes.

Le travail que nous avons entrepris a pour objectif principal l'extraction et l'étude phytochimique et biologique des extraits sélectifs de la *Thapsia garganica* L. (partie feuilles et racines) de la région de Saida « Ain el hadjer » et les mêmes pour la plante *Prunus persica* L. (partie feuilles) de la région de Naâma «Moughrar ». Elles étaient choisies parmi les espèces les moins étudiées tout en prenant en considération leur caractère endémique. Donc, ce travail se veut une contribution à une meilleure connaissance de ces espèces végétales.

D'abord, un screening phytochimique, en tant qu'analyse qualitative, a mis en évidence la richesse de ces deux plantes en métabolites secondaires comme les flavonoïdes, les tanins condensés, les stérols et les stéroïdes, les hétérosides, les coumarines et les saponosides, ces métabolites secondaires ont de grandes valeurs thérapeutiques.

Nous avons analysé et séparé les différents extraits (Acétate d'éthyle, éther d'éthylque et tanins) par les méthodes quantitatives et qualitatives : par la chromatographie sur couche mince (CCM) et la chromatographie sur colonne (CC), ou nous avons pu isoler six produits purs.

Les huiles essentielles issues des feuilles de la plante *Thapsia garganica* ont été extraites par hydrodistillation. La composition chimique des huiles essentielles extraites a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse. Dans cette partie, il ressort que les feuilles de *Thapsia garganica* ont un bon rendement en huiles essentielles (18,10%). Les résultats de l'analyse de la composition chimique indiquent : Un chimotype riche en monoterpènes oxygénés, dont ils sont dominé par : (+)-3-carene, 10-acetylmethyl (25,69 %).

Conclusion générale et perspectives

Les analyses spectroscopiques (IR et RMN ^1H , ^{13}C) nous a permis de proposer une structure préliminaire de la fraction PPAE4 séparée de l'extrait acétate d'éthyle des feuilles de *Prunus persica*. Les résultats trouvés sont conforme à celle de la littérature, qui indiquent que le produit séparé est un composé aromatique de type flavonoïde. Mais il est préférable de réaliser d'autres techniques d'analyses tels que la RMN 2D et la spectroscopie de masse pour confirmer la structure chimique finale de ce composé.

En outre, ce travail nous a permis de quantifier les composés phénoliques en utilisant les techniques universelles appropriées après avoir effectué des analyses chromatographiques analytiques de ces composés (polyphénols, flavonoïdes,...etc.) contenus dans les deux plantes étudiées.

Le dosage des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu, des flavonoïdes en utilisant la méthode au chlorure d'aluminium, et de tanins condensés par la méthode de Butanol-HCl, nous a permis d'obtenir les résultats suivants : les feuilles de la plante *P. persica* possèdent la teneur la plus élevée en composés phénoliques de l'ordre de $2,54 \pm 0,88$ mg EAG/ 100 g Ps, et de même pour la teneur en flavonoïdes $3,42 \pm 1,19$ mg EC/ 100 mg Ps. Tandis que la meilleure teneur en tanins condensés a été enregistré dans les feuilles de la plante *T. garganica* avec un pourcentage de $0,12 \pm 0,04$ 88 mg EAG/ 100 g Ps.

L'évaluation antioxydante *in vitro* des extraits méthanoliques, tanins et flavonoïdes via la technique de DPPH a été effectuée en comparaison avec l'acide ascorbique montre que les extraits étudiés possèdent une capacité de neutralisation du radical libre DPPH importantes. Nous avons remarqué une activité antioxydante moyenne des différents extraits de deux plantes étudiées, dont les valeurs des CI_{50} sont comprises entre 0,39 et 1,90 mg/ml. Ces résultats sont presque similaires à la capacité du piégeage du radical DPPH• de l'acide ascorbique ($\text{CI}_{50} = 0,12$ mg/ml). Tandis que les extraits saponosides des racines de TG ont un faible effet sur ce radical ($\text{CI}_{50} = 8,42$ mg/ml). La méthode du FRAP de sa part, montre que l'absorbance de tous les extraits testés est nettement inférieur à celui de l'acide ascorbique. Qui explique que ces extraits dotent d'un bon pouvoir de réduction du fer.

Les dix extraits testés présentent une activité antibactérienne et antifongique mais à spectre étroit. Les souches qui enregistrent une sensibilité vis-à-vis les extraits de *Thapsia garganica* sont : *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* avec des diamètres d'inhibition varie de 8 à 11 mm. Par contre, les souches *E. coli*, *Salmonella typhimurium* et *Klebsiella pneumonia* présentent de grandes résistances aux extraits sélectifs de *Thapsia garganica*. Le meilleur effet antibactérien a été enregistré nettement contre la souche

Conclusion générale et perspectives

Pseudomonas aeruginosa par l'extrait saponosides des feuilles avec un diamètre d'inhibition de 20 mm pour la concentration 0.5 mg/ml.

En ce qui concerne l'activité antifongique, il ressort que les fractions des flavonoïdes de la plantes TG présentent les meilleurs pouvoirs fongicides sur les deux espèces de champignons testées. La *Penicillium purpurogenum* est la souche fongique la plus influente à la présence de nos extraits par rapport à l'*Aspargillus flavus*. Dont la fraction acétate d'éthyle de l'extrait flavonoïde a marqué un diamètre de croissance de 05 mm pour les deux concentrations 0,25 et 0,5 g/ml. Par contre, la plante *Prunus persica* a révélée inactive contre toutes les souches bactériennes et fongiques testées.

Une étude préliminaire de l'activité antibactérienne in-vivo nous a montré que les extraits flavonoïdes de la plante *Thapsia garganica* ont un pouvoir remarquable dans l'inhibition de la croissance de la souche *Pseudomonas aeruginosa* provoquée sur des plaies aux dos des lapins traités, ce qui a été prouvé par l'arrêt de pousse de cette souche avec la diminution de la température des lapins, ainsi que la réduction des tailles des plaies dans une période de 07 jours.

Notons enfin que ce travail va nous ouvrir des horizons de recherche ciblés dans le domaine des plantes utilisées en médecine traditionnelle dans les zones arides, notamment en termes de mise en évidence des principes actifs et l'évaluation de leurs activités biologiques.

Par le biais de ce travail, nous espérons avoir apporté notre modeste contribution à la valorisation de la médecine traditionnelle pour parvenir à mettre à la disposition de la population des médicaments à base de plantes médicinales efficaces et accessibles.



Références bibliographiques

- Achat, S. (2013). Polyphénols de l'alimentation : extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques (Doctoral dissertation, Université d'Avignon ; Université Abderrahmane Mira – Bejaïa).
- AFNOR (1996). Détermination des huiles essentielles, Indice de classement. NF-75-006, Paris.
- AFNOR (2000). « Recueil de normes : les huiles essentielles. Tome 2. Monographies relatives aux huiles essentielles ». AFNOR, Paris, 2000, 661-663.
- Ahmad, I., Aqil, F., & Owais, M. (Eds.). (2006). *Modern phytomedicine: Turning medicinal plants into drugs*. John Wiley & Sons.
- Alghazeer, R., El-Saltani, H., Saleh, N., Al-Najjar, A., & Hebail, F. (2012). Antioxidant and antimicrobial properties of five medicinal Libyan plants extracts. *Natural science*, 4(5), 324-335.
- Amadou, I., Amza, T., Shi, Y. H., & Le, G. W. (2011). Chemical analysis and antioxidant properties of foxtail millet bran extracts. *Songklanakarin Journal of Science & Technology*, 33(5).
- Andersen, T. B., López, C. Q., Manczak, T., Martinez, K., & Simonsen, H. T. (2015). Thapsigargin—from Thapsia L. to mipsagargin. *Molecules*, 20(4), 6113-6127.
- Andersen, T. B., Martinez-Swatson, K. A., Rasmussen, S. A., Boughton, B. A., Jørgensen, K., Andersen-Ranberg, J., ... & Simonsen, H. T. (2017). Localization and in-vivo characterization of Thapsia garganica CYP76AE2 indicates a role in Thapsigargin biosynthesis. *Plant Physiology*, 174(1), 56-72.
- Andersen, T. B., Rasmussen, S. A., Christensen, S. B., & Simonsen, H. T. (2019). Biosynthesis of tovarol and other sesquiterpenoids in Thapsia laciniata Rouy. *Phytochemistry*, 157, 168-174.
- Andreotti, C., Ravaglia, D., Ragaini, A., & Costa, G. (2008). Phenolic compounds in peach (*Prunus persica*) cultivars at harvest and during fruit maturation. *Annals of Applied Biology*, 153(1), 11-23.
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127(1), 183-198.
- Appelbaum, M., Forrat, C., Nillus, P., Duracq, I., Faivre, J., & Vanbustel, V. (1989). Diététique et nutrition. *Abrégés de médecine*.
- Atanasova, M., & Ribarova, F. (2010). Phénols et flavonoïdes totaux dans les extraits secs des feuilles des bouleaux argentés bulgares (*Betula pendula*). *Revue de génie industriel*. ISSN 1313-8871.
- Athmouni, K., Belghith, T., Bellassouad, K., & EL, A. (2015). Effect of solvent polarity on the content of biomolecules and antioxidant activity of Thapsia garganica (Apiaceae). *Algerian Journal of Natural Products*, 3(3), 194-208.
- Avato, P. (1991). Essential oil of Thapsia garganica. *Planta medica*, 57(06), 585-586.
- Avato, P., Fanizzi, F. P., & Rosito, I. (2001). The genus Thapsia as a source of petroselinic acid. *Lipids*, 36(8), 845-850.

- Backheet, E. Y., Farag, S. F., Ahmed, A. S., & Sayed, H. M. (2003). Flavonoids and cyanogenic glycosides from the leaves and stem bark of *Prunus persica* (L.) Batsch (Meet Ghamr) peach local cultivar in Assiut region. *Bulletin of Pharmaceutical Sciences*. Assiut, 26(1), 55-66.
- Bahorun, T. (1998). Substances naturelles actives: la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. In *Second Annual Meeting of Agricultural Scientists* (Vol. 83).
- Barahona Rosales, R. (1999). Condensed tannins in tropical forage legumes: Their characterisation and study of their nutritional impact from the standpoint of structure-activity relationships. Thesis (Ph. D.) (Doctoral dissertation, University of Reading, Department of Agriculture).
- Baldermann, S. (2008). Carotenoid oxygenases from *Camellia sinensis*, *Osmanthus fragrans*, and *Prunus persica nucipersica*. (Doctoral dissertation, Université technique de Brunswick Allemagne).
- Bammi, J., & Douira, A. (2004). Contribution à la connaissance de la flore vasculaire de la forêt de l'achach, plateau central (Maroc). *Acta botanica malacitana*, 29, 23-41.
- Bassi, D., & Monet, R. (2008). Botany and taxonomy. The peach: botany, production and uses, 1-36.
- Battandier JA (1900). Algérie; plantes médicinales. Giralt, Alger.
- Baudoux, D., Breda, M. L., & Zhiri, A. (2009). Huiles essentielles chémotypées. Pranarôm Editions Inspir development, Luxembourg.
- Bedjou, F. E., & Berri, Y. (2011). Etude des activités inflammatoire, analgésique, toxiques et antioxydants des extraits de *Thapsia garganica*. Le 2ème Séminaire International sur les Plantes Médicinales SIPM'2. Ouargla.
- Bekkara, F., Jay, M., Viricel, M. R., & Rome, S. (1998). Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of two *Vicia faba* cvs differing in their seed tannin content, and study of their seed and root phenolic exudations. *Plant and Soil*, 203(1), 27-36.
- Bellakhdar, J. (1997). Contribution à l'étude de la pharmacopée traditionnelle au Maroc: la situation actuelle, les produits, les sources du savoir (enquête ethnopharmacologique de terrain réalisée de 1969 à 1992) (Doctoral dissertation, Université Paul Verlaine-Metz).
- Benamara, S., Gougam, H., Amellal, H., Djouab, A., Benahmed, A., & Noui, Y. (2008). Some technologic proprieties of common date (*Phoenix dactylifera* L.) fruits.
- Benhammou, N., Ghambaza, N., Benabdelkader, S., Atik-Bekkara, F., & Panovska, F. K. (2013). Phytochemicals and antioxidant properties of extracts from the root and stems of *Anabasis articulata*. *International Food Research Journal*, 20 (5), 2057.
- Benkrief, R., Brum-Bousquet, M., Tillequin, F., & Koch, M. (1990). Alcaloïdes et flavonoïde des parties aériennes de *Hammada articulata* ssp. *socparia*. In *Annales pharmaceutiques françaises* (Vol. 48, No. 4, pp. 219-224).
- Berigaud, E., Silvera, L., Du Bron, D., Dupont-Zacot, E., Chabry, C., Trutt, B., ... & Hecquard, P. (2002). Secondary prevention of myocardial infarction in the Ile de France. *Archives des Maladies du Coeur et des Vaisseaux*, 95(3), 150-156.

- Betina-Bencharif, S. (2014). Isolement et caractérisation de saponosides extraits de deux plantes médicinales: *Cyclamen africanum*, *Zygophyllum cornutum* et évaluation de leur activité anti-inflammatoire (Doctoral dissertation, Université de Bourgogne; Université Mentouri-Constantine).
- Bonnet, R., Caron, F., Cavallo, J. D., Chardon, H., Chidiac, C., Courvalin, P., ... & Weber, P. (2013). Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. In Recommandations. <http://www.sfm-microbiologie.org/>
- Bouchouka, E., (2016). Extraction des polyphénols et étude des activités antioxydante et antibactérienne de quelques plantes Sahariennes (Doctoral dissertation, Université de Annaba).
- Bouchut, E. (1883). *Traité des signes de la mort et des moyens de prévenir les inhumations prématurées: ouvrage couronné...* Baillière.
- Bouhdid, S., Idaomar, M., Zhiri, A., Baudoux, D., Skali, N. S., & Abrini, J. (2006). Thymus essential oils: chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities. *Congrès international de biochimie*, 324, 327.
- Boumediou, A. S. M. A., & Addoun, S. (2017). Étude ethnobotanique sur l'usage des plantes toxiques, en médecine traditionnelle, dans la ville de Tlemcen (Algérie). (Doctoral dissertation, Université Abo Bekr Belkaid, Tlemcen).
- Bourahla, S. (2018). Etude des phénomènes d'adsorption par la spectroscopie IRTF. (Doctoral dissertation, University Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem).
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Broegger Christensen, S., Kjoeller Larsen, I., Rasmussen, U., & Christophersen, C. (1982). Thapsigargin and thapsigarginin, two histamine liberating sesquiterpene lactones from *Thapsia garganica*. X-ray analysis of the 7, 11-epoxide of thapsigargin. *The Journal of Organic Chemistry*, 47(4), 649-652.
- Bruneton J. (1999). *Parmacognosie Phytochimie Plantes médicinales*. Edition : Tec & Doc. Paris, 1120 p.
- Bruneton J. (2005). *Plantes toxique pour l'Homme et les animmaux* ». 3 émeed. Edition Lavoisier. p: 111-112.
- Burits, M., & Bucar, F. (2000). Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy research*, 14(5), 323-328.
- Casiglia, S., Riccobono, L., Bruno, M., Rosselli, S., Senatore, F., & Senatore, F. (2016). Chemical composition of the essential oil from *Thapsia garganica* L.(Apiaceae) grown wild in Sicily and its antimicrobial activity. *Natural product research*, 30(9), 1042-1052.
- Cauvet (1926). *Le chameau*. Volume I. Librairie J. B. Baillière et Fils, Paris.
- Celiktas, O. Y., Kocabas, E. H., Bedir, E., Sukan, F. V., Ozek, T., & Baser, K. H. C. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, 100(2), 553-559.

- Chai, M. N., & Isa, M. I. N. (2013). The oleic acid composition effect on the carboxymethyl cellulose based biopolymer electrolyte.
- Chang, S., Tan, C., Frankel, E. N., & Barrett, D. M. (2000). Low-density lipoprotein antioxidant activity of phenolic compounds and polyphenol oxidase activity in selected clingstone peach cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 147-151.
- Chavan, U. D., Shahidi, F., & Naczki, M. (2001). Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. *Food chemistry*, 75(4), 509-512.
- Christensen, S. B., Andersen, A., Poulsen, J. C. J., & Treiman, M. (1993). Derivatives of thapsigargin as probes of its binding site on endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase: Stereoselectivity and important functional groups. *FEBS letters*, 335(3), 345-348.
- Cia Máximo, P., Lourenço, A., Feiob, S. S., & Roseirob, J. C. (2000). Flavonoids from *Ulex* Species. *Z. Naturforsch.* 55c, 506- 510.
- Codex Alimentarius (2009). Normes alimentaires Internationales pour les huiles végétales portant un nom spécifique CODEX STAN 210-1999. Adoptée en 1999. Amendement : 2005, 2011, 2013, 2015. Révision : 2001, 2003, 2009. CODEX ALIMENTARIUS.
- Córdova, W. H. P., Mesa, L. G., Hill, A. L. P., Lima, C. N., Lamas, G. D., Suárez, M. O., & Domínguez, R. S. (2006). Antimicrobial activity of crude extracts and flavonoids from leaves of *Pluchea carolinensis* (Jacq.) G. Don. *Pharmacologyonline*, 3, 757-761.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
- Cuong, D. T. D., Dat, H. T., Duan, N. T., Thuong, P. D., Phat, N. T., Tri, M. D., ... & Phung, N. K. P. (2019). Isolation and characterization of six flavonoids from the leaves of *Sterculia foetida* Linn. *Vietnam Journal of Chemistry*, 57(4), 438-442.
- Daas Amieur, S. (2009). Etude quantitative des composés phénoliques des extraits de trois variétés de dattes (*Phoenix dactylifera* L.) Et évaluation in vitro de leur activité biologique (Doctoral dissertation, Université de Batna 2).
- Dacosta, Y. (2003). Les phytonutriments bioactifs: 669 références bibliographiques. Ed. Yves Dacosta.
- Dalla Valle, A. Z., Mignani, I., Spinardi, A., Galvano, F., & Ciappellano, S. (2007). The antioxidant profile of three different peaches cultivars (*Prunus persica*) and their short-term effect on antioxidant status in human. *European Food Research and Technology*, 225(2), 167-172.
- Danie Poiret (2011). Mr plante et les plantes médicinaux : Pour tout savoir sur les plantes qui soignent. <http://www.mr-plantes.com/2011/03/pecher-prunuspersica/>. Consulter le 30/09/2021.
- Derbel, S., & Ghedira, K. (2005). Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie*, 3(1), 28-34.
- Dhingra, N., Sharma, R., & Kar, A. (2014). Towards further understanding on the antioxidative activities of *Prunus persica* fruit: A comparative study with four different fractions. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 132, 582-587.

- Diallo, A. (2005). Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd.(Myrtaceae). PhD. of the University Bamako, Mali, 38-47.
- Djahida, S., Imane, S., & Mourad, D. (2011). Résistance aux antibiotiques des entérobactéries au niveau du CHU de Sidi Bel Abbes (Algérie). *MHA (Sousse)*, 23(67), 37-41.
- Djenidi, H. (2020). Activité antioxydante et antiradicalaire des aliments d'origine végétale consommés dans la région de Biskra (Doctoral dissertation, Université Mohamed Khider, Biskra).
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., & Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food chemistry*, 97(4), 654-660.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., & Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food chemistry*, 97(4), 654-660.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Vidal, N., Lesgards, J. F., & Stocker, P. (2007). Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology*, 224(6), 801-809.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Brunel, J. M., & Stocker, P. (2010). Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food and Chemical Toxicology* 48, 2599–2606.
- Doré, C., & Varoquaux, F. (2006). Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées. Editions Quae.
- Evergetis, E., & Haroutounian, S. A. (2014). Exploitation of apiaceae family plants as valuable renewable source of essential oils containing crops for the production of fine chemicals. *Industrial Crops and Products*, 54, 70-77.
- Fauchère, J. L., & Avril, J. L. (2002). Bactériologie générale et médicale. Ed. Ellipses. 365 P.
- Faust, M., & Timon, B. (1995). Origin and dissemination of peach. *Horticultural Reviews*, 17, 331-379.
- Favier, A. (2003). Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108(10), 863-832.
- Fellah, K., Amrouche, A., Benmehdi, H., & Memmou, F. (2019). Phenolic profile, antioxidants and kinetic properties of flavonoids and Tannins Fractions isolated from *Prunus persica* L. leaves growing in Southwest Algeria. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 12(9), 4365-4372.
- Fellah, K., (2020). Criblage des activités biologiques de phyto-constituants extraits de *Prunus persica* L. et *Morus alba* L. de la région de Béchar. (Doctoral dissertation, Université Tahri Mohamed, Béchar).
- Feng, W., Hao, Z., & Li, M. (2017). Isolation and structure identification of flavonoids. *Flavonoids, from biosynthesis to human health/Ed. by Justino GC Intech Open*, 17-43.

- Fernandes Queiroz, M., Melo, K. R. T., Sabry, D. A., Sasaki, G. L., & Rocha, H. A. O. (2015). Does the use of chitosan contribute to oxalate kidney stone formation?. *Marine drugs*, 13(1), 141-158.
- Filliat, P. (2012). Les plantes de la famille des Apiacées dans les troubles digestifs. (Doctoral dissertation, Université Joseph Fourier).
- Foutse, Y. (2017). Enquête ethnobotanique sur les plantes médicinales utilisées dans la région de l'ouest cameroun. Etude phytochimique et pharmacologique d'*Afzelia africana* J.E. Smith ex Pers. (Doctoral dissertation, Université d'Aix- Marseille).
- Gasparotto, J., Somensi, N., Bortolin, R. C., Moresco, K. S., Girardi, C. S., Klafke, K., ... & Gelain, D. P. (2014). Effects of different products of peach (*Prunus persica* L. Batsch) from a variety developed in southern Brazil on oxidative stress and inflammatory parameters in vitro and ex vivo. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 55(2), 110-119.
- Gbogbo, K. A., Agban, A., Woegan, Y. A., Amana, E. K., Hoekou, P. Y., Batawila, K., ... & Akpagana, K. (2013). Evaluation de l'activité antimicrobienne de *Momordica charantia* (cucurbitaceae), *Psidium guajava* (myrtaceae) et *Pteleopsis suberosa* (combretaceae). *European scientific journal*, 9(36).
- Geneviève M., Marie-Claude ., Jacques L. (2011). Méthodes de laboratoire. Dénombrement des bactéries et moisissures cultivables de l'air prélevées sur filtre de polycarbonate. Méthode Analytique 368. Bibliothèque et Archives nationales. ISBN : 978-2-89631-258-0.
- Ghedadba, N. (2018). Contribution à l'étude de l'activité biologique des deux espèces de *Marrubium vulgare* L et *Marrubium deserti* de Noé in vitro et in vivo (Doctoral dissertation, Université de Batna 2).
- Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3(4), 162-169.
- Gil, M. I., Tomás-Barberán, F. A., Hess-Pierce, B., & Kader, A. A. (2002). Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(17), 4976-4982.
- Gomez, F. L. M. (2007). Síntesis de análogos de las taspigarginas (Doctoral dissertation, Université de Cádiz).
- Gorinstein, S., Martin-Belloso, O., Lojek, A., Číž, M., Soliva-Fortuny, R., Park, Y. S., ... & Trakhtenberg, S. (2002). Comparative content of some phytochemicals in Spanish apples, peaches and pears. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(10), 1166-1170.
- Guillouty, A. (2016). Plantes médicinales et antioxydants (Doctoral dissertation, Université Toulouse III-Paul Sabatier).
- Gupta, A., Naraniwal, M., & Kothari, V. (2012). Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. *International journal of applied and natural sciences*, 1(1), 8-26.
- Hachem, K., Mébarki, M., Hartani, A., Benabdesslem, Y., & Kaid-Harche, M. (2017). Essential Oil Composition of the Root Bark of *Thapsia garganica* (L.) Growing in Northwestern Algeria. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 20(3), 860-863.

- Hadj Salem, J. (2009). Extraction, identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de *Nitraria retusa* et synthèse de dérivés acyles de ces molécules par voie enzymatique (Doctoral dissertation, Institut National Polytechnique de Lorraine).
- Hakii, H., Fujiki, H., Suganuma, M., Nakayasu, M., Tahira, T., Sugimura, T., ... & Christensen, S. B. (1986). Thapsigargin, a histamine secretagogue, is a non-12-O-tetradecanolphorbol-13-acetate (TPA) type tumor promoter in two-stage mouse skin carcinogenesis. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 111(3), 177-181.
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. (2007). Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, 62(10), 628-38.
- Hand, R. (2011). The Euro Med treatment of Apiaceae. *Willdenowia*, 41(2), 245-250.
- Harborne, A. J. (1998). *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*. Springer science & business media. p. 37-99.
- Harborne, J. B., & Williams, C. A. (1972). Flavonoid patterns in the fruits of the Umbelliferae. *Phytochemistry*, 11(5), 1741-1750.
- Hassen, I., M'Rabet, Y., Belgacem, C., Kesraoui, O., Casabianca, H., & Hosni, K. (2015). Chemodiversity of volatile oils in *Thapsia garganica* L.(Apiaceae). *Chemistry & biodiversity*, 12(4), 637-651.
- Hemingway, R. W. (1989). Structural variations in proanthocyanidins and their derivatives. In *Chemistry and significance of condensed tannins* (pp. 83-107). Springer, Boston, MA.
- Heywood, V. H., Moore, D. M., Richardson, I. B. K., & Stearn, W. T. (1993). *Flowering plants of the world* (No. 582.13 F644). Oxford university press.
- Hölker, U., & Lenz, J. (2005). Solid-state fermentation—are there any biotechnological advantages?. *Current opinion in microbiology*, 8(3), 301-306.
- Houël, E. (2011). Etude de substances bioactives issues de la flore amazonienne. Analyse de préparations phytothérapeutiques à base de *Quassia amara* L.(Simaroubaceae) et de *Psidium acutangulum* DC.(Myrtaceae) utilisées en Guyane française pour une indication antipaludique. Identification et analyse métabolomique d'huiles essentielles à activité antifongique (Doctoral dissertation, Université des Antilles-Guyane).
- Hyardin, A. (2008). Étude de la fonctionnalité alimentaire de plats industriels (Doctoral dissertation, Institut National Polytechnique de Lorraine).
- Ibrahim, A. M. M., Martinez-Swatson, K. A., Benkaci-Ali, F., Cozzi, F., Zoulikha, F., & Simonsen, H. T. (2018). Effects of gamma irradiation and comparison of different extraction methods on sesquiterpene lactone yields from the medicinal plant *Thapsia garganica* L.(Apiaceae). *Journal of applied research on medicinal and aromatic plants*, 8, 26-32.
- Inesi, G., & Sagara, Y. (1992). Thapsigargin, a High Affinity and Global Inhibitor of Intracellular Ca²⁺ Transport ATPases. *Archives of biochemistry and biophysics*, 298, 313-313.
- Jäger, A. K., Schottländer, B., Smitt, U. W., & Nyman, U. (1993). Somatic embryogenesis in cell cultures of *Thapsia garganica*. *Plant cell reports*, 12(9), 517-520.

Références bibliographiques

- Janczewski, A. M., & Lakatta, E. G. (1993). Thapsigargin inhibits Ca²⁺ uptake, and Ca²⁺ depletes sarcoplasmic reticulum in intact cardiac myocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 265(2), H517-H522.
- Jawetz, E., Melnick, J. L., & Adelberg, E. A. (1973). *Microbiologie médicale*. Presses Université Laval.
- Jean, F. I. (1992). Analyse de produits naturels de *Taxus canadensis*. (Doctoral dissertation, Université du Québec à Chicoutimi), 113p.
- Jmii, G., Khadhri, A., & Haouala, R. (2020). Thapsia garganica allelopathic potentialities explored for lettuce growth enhancement and associated weed control. *Scientia Horticulturae*, 262, 109068.
- Jokic, S., Velic, D., Bilic, M., Bucic-Kojic, A., Planinic, M., & Tomas, S. (2010). Modelling of the process of solid-liquid extraction of total polyphenols from soybeans. *Czech Journal of Food Sciences-UZEI (Czech Republic)*.
- Jothy, S. L., Zuraini, Z., & Sasidharan, S. (2011). Phytochemicals screening, DPPH free radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activities of *Cassia fistula* seeds extract. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(10), 1941-1947.
- Judd WS, Christopher S, Elizabeth AC, Kellogg F, Stevens P, Donoghue JM (1999). Plant systematics. A phylogenetic approach. Sinauer associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts, US, 2: 365-372.
- Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., & Stevens, P. (2002). *Botanique systématique: une perspective phylogénétique*. De Boeck Supérieur.
- Kahlon, T. S., & Smith, G. E. (2007). In vitro binding of bile acids by bananas, peaches, pineapple, grapes, pears, apricots and nectarines. *Food Chemistry*, 101(3), 1046-1051.
- Kaloustian, J., & Hadji-Minaglou, F. (2012). *La connaissance des huiles essentielles: Qualitologie et aromathérapie: entre science et tradition pour une application médicale raisonnée*. Collection Phytothérapie pratique, Springer-Verlag, Paris, France.
- Kant, R., Shukla, R. K., & Shukla, A. (2018). A review on peach (*Prunus persica*): an asset of medicinal phytochemicals. *Int J Res Appl Sci Eng Technol*, 6(1), 2186-2200.
- Kansole, M. M. R. (2009). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso : cas de *Leucas martinicensis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia opposita* vahl et *Orthosiphon pallidus* royle ex benth. (Mémoire pour obtenir un diplôme d'Études Approfondies (D.E.A) en Sciences Biologiques Appliquées, Université d'Ouagadougou, Burkina Faso).
- Karagözler, A. A., Erdağ, B., Emek, Y. Ç., & Uygun, D. A. (2008). Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastata*. *Food Chemistry*, 111(2), 400-407.
- Karimov, A. M., Slobodyanyuk, T. N., & Botirov, E. K. (2017). New Flavonoid Glucuronides from the Aerial Part of *Scutellaria intermedia*. *Chemistry of Natural Compounds*, 53(4), 638-641.

- Kholkhal, F., Lazouni, H. A., Bendahou, M., Boublenza, I., Chabane, S. D., & Chaouch, T. (2013). Étude phytochimique et évaluation de l'activité anti-oxydante de *Thymus Ciliatus* ssp. *Coloratus*. *Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie*, 9(1), 151-158.
- Khoudali, S., Benmessaoudleft, D., Essaqui, A., Zertoubi, M., Azzi, M., & Benaissa, M. (2014). Étude de l'activité antioxydante et de l'action anti corrosion de l'extrait méthanolique des feuilles du palmier nain (*Chamaerops humilis* L.) du Maroc. *Journal of Materials and Environmental Science*, 5(3), 887-898.
- Krief, S. (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées (Doctoral dissertation, Museum national d'histoire naturelle-MNHN PARIS).
- Ladjel, S., Zellagui, A., & Gherraf, N. (2011). Reinvestigation of essential oil content of *Thapsia garganica* grown in the east of Algeria. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 3(2), 165-168.
- Lagnika, L. (2005). Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises (Doctoral dissertation, Université Strasbourg 1).
- Lahbari, M. (2015). Etude et simulation du séchage de l'abricot: Application a quelques variétés de la région des Aures (Doctoral dissertation, Université de Batna 2).
- Lamaison, J. L., Petitjean-Freytet, C., & Carnat, A. (1991). Medicinal Lamiaceae with antioxidant properties, a potential source of rosmarinic acid. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 66(7), 185-188.
- Lamamra, M. (2018). Activités biologiques et composition chimique des huiles essentielles d'*Ammiopsis aristidis* Coss.(Syn. *Daucus aristidis* Coss.) et d'*Achillea santolinoides* Lag (Doctoral dissertation, Université Setif).
- Larsen, P. K., Nielsen, B. E., & Lemmich, J. O. H. N. (1970). Constituents of umbelliferous plants. *Acta Chemica Scandinavica*, 24(3), 1113-1117.
- Le floch Edouard (1983). Contribution à une étude ethnobotanique de la flore tunisienne. Publ. sci. Tunisienne. *Journal d'Agriculture Traditionnelle et de la Botanique*. P.129.
- Leterme, E., & Lespinasse, J. M. (2008). Les fruits retrouvés : patrimoine de demain. Editions du Rouergue.
- Li, A. N., Li, S., Zhang, Y. J., Xu, X. R., Chen, Y. M., & Li, H. B. (2014). Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*, 6(12), 6020-6047.
- Lim, S. F., Pah, P. Y. L., Chua, S. N., & Kuan, H. T. (2017). Optimisation of Water Soluble Essential Oil from Lemongrass Leaves using Steam Distillation. *Pertanika Journal of Science & Technology*, 25.
- Liu, H., Jensen, K. G., Tran, L. M., Chen, M., Zhai, L., Olsen, C. E., ... & Christensen, S. B. (2006). Cytotoxic phenylpropanoids and an additional thapsigargin analogue isolated from *Thapsia garganica*. *Phytochemistry*, 67(24), 2651-2658.

- Liu, H., Jensen, K. G., Tran, L. M., Chen, M., Zhai, L., Olsen, C. E., ... & Christensen, S. B. (2006). Cytotoxic phenylpropanoids and an additional thapsigargin analogue isolated from *Thapsia garganica*. *Phytochemistry*, 67(24), 2651-2658.
- Lurie, S., & Crisosto, C. H. (2005). Chilling injury in peach and nectarine. *Postharvest biology and technology*, 37(3), 195-208.
- Lutz, M., Henríquez, C., & Escobar, M. (2011). Chemical composition and antioxidant properties of mature and baby artichokes (*Cynara scolymus* L.), raw and cooked. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(1), 49-54.
- M. R. Saha, S. M. R. Hasan, R. Akter, M. M. Hossain, M. S. Alam, M. A. Alam, and M. E. H. Mazumder (2008). In vitro free radical scavenging activity of methanol extract of the leaves of *Mimusops elengi* Linn. *Bangl. J. Vet. Med.* 6 (2): 197–202.
- Mabry, T. J., Kagan, J., & Rosler, H. (1964). Nuclear Magnetic Resonance Analysis of Flavonoids. Department of Botany and Cell Research Institute. The University of Texas, Austin, Texas. N°6418.
- Mabry, T. J., Markham, K. R., & Thomas, M. B. (1970). The determination and interpretation of NMR spectra of flavonoids. In *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer, Berlin, Heidelberg. 253-273.
- Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR presses polytechniques.
- Magalhães, A. F., Tozzi, A. M., Magalhães, E. G., Blanco, I. S., & Soriano, M. D. P. C. (2004). Flavonoids from *Lonchocarpus muehlbergianus*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 76(4), 651-661.
- Mahmoudi, S., Khali, M., & Mahmoudi, N. (2013). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technology*, (9), 35.
- Manzoor, M., Anwar, F., Mahmood, Z., Rashid, U., & Ashraf, M. (2012). Variation in minerals, phenolics and antioxidant activity of peel and pulp of different varieties of peach (*Prunus persica* L.) fruit from Pakistan. *Molecules*, 17(6), 6491-6506.
- Maouni, A., Lamarti, A., Douira, A., & Badoc, A. (2002). Étude de la résistance d'*Alternaria alternata* et de *Penicillium expansum* aux fongicides lors de la conservation des poires. *Bulletin-Societe de Pharmacie de Bordeaux*, 141(1/4), 61-72.
- Marès, P., & Vigineix, G. (1880). *Catalogue raisonné des plantes des îles Baléares*.
- Martins, N., Barros, L., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. (2016). Antioxidant potential of two Apiaceae plant extracts: A comparative study focused on the phenolic composition. *Industrial Crops and Products*, 79, 188-194.
- Milcent, R., & Chau, F. (2012). *Chimie organique hétérocyclique (Structures fondamentales)*. EDP Sciences.

- Mitic, V., Ilic, M., Dimitrijevic, M., Cvetkovic, J., Ciric, S., & Jovanovic, V. S. (2016). Chemometric characterization of peach, nectarine and plum cultivars according to fruit phenolic content and antioxidant activity. *Fruits*, 71(1), 57-66.
- Mnayer, D. (2014). Eco-Extraction des huiles essentielles et des arômes alimentaires en vue d'une application comme agents antioxydants et antimicrobiens (Doctoral dissertation, Université d'Avignon).
- Mohammedi, Z. (2013). Etude phytochimique et activités biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie. (Doctoral dissertation, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen).
- Mokrani, A., & Madani, K. (2016). Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit. *Separation and purification Technology*, 162, 68-76.
- Mostafa, E. S., Maher, A., Mostafa, D. A., Gad, S. S., Nawwar, M. A., & Swilam, N. (2021). A Unique Acylated Flavonol Glycoside from *Prunus persica* (L.) var. Florida Prince: A New Solid Lipid Nanoparticle Cosmeceutical Formulation for Skincare. *Antioxidants*, 10(3), 436.
- Nadjib, B. M., Hamaidi, M. S., & Saidi, F. (2010). Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium Rosat (*Pelargonium graveolens* L.) cultivé la plaine de Mitidja (Algérie). *Revue nature et technologie*, 2(2), 37-45.
- Neffati, N., Aloui, Z., Karoui, H., Guizani, I., Boussaid, M., & Zaouali, Y. (2017). Phytochemical composition and antioxidant activity of medicinal plants collected from the Tunisian flora. *Natural product research*, 31(13), 1583-1588.
- Nemlin, J., & Brunel, J. F. (1995). Fascicule de travaux pratiques de matière médicale (3ème année). Département de Pharmacognosie, Laboratoire de Phytologie, Faculté de Pharmacie, Université Nationale de Côte d'Ivoire.
- Niassy, B., Um, B. H., Lobstein, A., Weniger, B., Koné, M., & Anton, R. (2004). Flavonoïdes de *Tephrosia deflexa* et *Tephrosia albifoliolis*. *Comptes Rendus Chimie*, 7(10-11), 993-996.
- Nkwokap, G. B. K. (2010). Isolement et caractérisation des saponosides de trois plantes de la famille des araliaceae et dracaenaceae et évaluation de leurs activités cytotoxiques sur cellules tumorales (Doctoral dissertation, Université de Bourgogne).
- Noël, K. J., Donatien, K., Tounkara, H., Amidou, D., & Garcia, J. (2016). Isolation and identification of three mono-glycosylated flavonoids from flowers of *Vernonia galamensis* Ssp. *galamensis* Var. *galamensis* M. Gilbert. (Isolement et identification de trois flavonols monoglycosylés des fleurs de *Vernonia galamensis* Ssp. galame. *Maghrebien Journal of Pure and Applied Science*, 2(2), 2-2.
- Noratto, G., Porter, W., Byrne, D., & Cisneros-Zevallos, L. (2009). Identifying peach and plum polyphenols with chemopreventive potential against estrogen-independent breast cancer cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(12), 5219-5226.
- Ojala, T., Remes, S., Haansuu, P., Vuorela, H., Hiltunen, R., Haahtela, K., & Vuorela, P. (2000). Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. *Journal of ethnopharmacology*, 73(1-2), 299-305.

- Okwu, D. E. (2005). Phytochemicals, vitamins and mineral contents of two Nigerian medicinal plants. *Int. J. Mol. Med. Adv. Sci*, 1(4), 375-381.
- Oliveira, R. N., Mancini, M. C., Oliveira, F. C. S. D., Passos, T. M., Quilty, B., Thiré, R. M. D. S. M., & McGuinness, G. B. (2016). FTIR analysis and quantification of phenols and flavonoids of five commercially available plants extracts used in wound healing. *Matéria (Rio de Janeiro)*, 21, 767-779.
- Ouis, N. (2015). Etude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, des fenouils et de persil. Diss. Thèse de doctorat, Université Ahmed Ben Bella-Oran, Alger.
- Oussou, K. R., Kanko, C., Guessend, N., Yolou, S., Dosso, M., N'Guessan, Y. T., ... & Koukoua, G. (2004). Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire. *Comptes Rendus Chimie*, 7(10-11), 1081-1086.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese journal of nutrition and dietetics*, 44(6), 307-315.
- P. Iserin, M. Masson, J. P. Restellini, Ybert E., De Laage de Meux A., Moulard F., Zha E., De la Roque R., De la Roque O., Vican P., Deesalle –Féat T., Biaujeaud M., Ringuet J., Bloth J., Botrel A. (2001). *Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins*. Ed. Larousse.
- Paolini, V., Dorchies, P., & Hoste, H. (2003). Effets des tanins condensés et des plantes à tanins sur les strongyloses gastro-intestinales chez le mouton et la chèvre. *Revue Alter Agri*, 61, 17-19.
- Pastre, J. (2005). Intérêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques (Doctoral dissertation).
- Perrot, É., Paris, R., & Pâris, R. (1971). *Les plantes médicinales*.
- Plazonić, A., Bucar, F., Maleš, Ž., Mornar, A., Nigović, B., & Kujundžić, N. (2009). Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in burr parsley (*Caucalis platycarpos* L.), using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Molecules*, 14(7), 2466-2490.
- Popovici, C., Saykova, I., & Tylkowski, B. (2010). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH.
- Porter, L. J., Hrstich, L. N., & Chan, B. G. (1985). The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry*, 25(1), 223-230.
- Prevot, V. (2013). Comparaison de la production de complexes enzymatiques par fermentation en milieu solide et par fermentation en milieu liquide (Doctoral dissertation, Reims).
- Price, M. L., Van Scoyoc, S., & Butler, L. G. (1978). A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(5), 1214-1218.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290-4302.

- Rached, W., Benamar, H., Bennaceur, M., & Marouf, A. (2010). Screening of the antioxidant potential of some Algerian indigenous plants. *Journal of Biological Sciences*, 10(4), 316-324.
- Rachid Meddour (2012). *Journal Le midi*. N° 1526. ISSN: 1112-7449./ www.lemidi-dz.com
- Raffo, A., Leonardi, C., Fogliano, V., Ambrosino, P., Salucci, M., Gennaro, L., ... & Quaglia, G. (2002). Nutritional value of cherry tomatoes (*Lycopersicon esculentum* cv. Naomi F1) harvested at different ripening stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6550-6556.
- Rasmussen, U. (1978). Thapsigargine and thapsigargicine, two new histamine liberators from *Thapsia garganica* L.
- Raturi, R., Sati, S.C., Singh, H., M. D. Sati, Bahuguna, P. and Badoni, P. P. (2011). Chemical examination and anti-inflammatory activity of *Prunus persica* steam bark. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. Vol 3, Suppl 5, 315-317.
- Reboulleau SD. (1856). Notice sur la résine de *Thapsia garganica* et sur son emploi en médecine comme agent révulsif sous forme d'emplâtre. Edition Abadie Constantine, 15.
- Règlement (CE) N° 1333/2008 du Parlement Européen et du Conseil. Les additifs alimentaires. Journal officiel de l'Union européenne. L 354/16.
- Reynaud, J. (2002). La flore du pharmacien. Tec & Doc : Ed. Médicales Internationales.
- Ribarova, F., & Atanassova, M. (2005). Total phenolics and flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the university of chemical technology and metallurgy*, 40(3), 255-260.
- Ribéreau-Gayon, P. (1974). Les composés phénoliques du raisin et du vin (Vol. 6, No. 2). Institut National de la Recherche Agronomique.
- Rossi, P. G. (2003). Caractérisation et valorisation des produits issus de la biomasse: activité biologique des huiles essentielles. Université de Corse, 2.
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., & Bruni, R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food chemistry*, 91(4), 621-632.
- Sahli, R. (2017). Etude phytochimique de quelques plantes extrêmophiles tunisiennes et exploration de leurs activités biologiques (Doctoral dissertation, Université du Droit et de la Santé-Lille II).
- Sağdıç, O. (2003). Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrosols. *LWT-Food Science and Technology*, 36(5), 467-473.
- Santiago Cintrón, M., Montalvo, J. G., Von Hoven, T., Rodgers, J. E., Hinchliffe, D. J., Madison, C., ... & Zeng, L. (2016). Infrared imaging of cotton fiber bundles using a focal plane array detector and a single reflectance accessory. *Fibers*, 4(4), 27.
- Sasikumar, J. M., Patharaj, J., Adithya, E. S., Christabel, P. H., & Shamna, R. (2012). Antioxidant capacity and phenolic content of *Elaeagnus kologa* schlecht. an underexploited fruit from India. *Free Radicals and Antioxidants*, 2(3), 28-35.

- Scordino, M., Sabatino, L., Muratore, A., Belligno, A., & Gagliano, G. (2012). Phenolic Characterization of Sicilian Yellow Flesh Peach (*Prunus persica* L.) Cultivars at Different Ripening Stages. *Journal of Food Quality*, 35(4), 255-262.
- Seghiri, R. (2009). Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires du genre *Centaurea* (Doctoral dissertation, Université Mentouri – Constantine).
- Serghat, S., Mouria, A., Touhami, A. O., Badoc, A., & Douira, A. (2004). Effet de quelques fongicides sur le développement in vitro de *pyricularia grisea* et *helminthosporium oryzae*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 143(7), 14.
- Silviya Georgieva, L., & Angelov, G. (2010). Caractérisation des vins bulgares par leur capacité antioxydante; Institut de génie chimique; Académie bulgare des sciences; Acad. Bonchev St., Block 103, 1113; Sofia; Bulgarie. *Revue de génie industriel*, 5, 124-132.
- Soubeiran E et Regwuld J. (1988). *Traité de pharmacie*. Edition : Masson. Paris.
- Soubeiran E. (1870). *Traité de pharmacie théorique et pratique*, Volume 2, edition Victor Masson & fils, Paris pp :861.
- Spichiger, R. E., Figeat-Hug, M., & Jeanmonod, D. (2002). Botanique systématique des plantes à fleurs: une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des régions tempérées et tropicales. PPUR presses polytechniques.
- Stocker, P., Yousfi, M., Djerridane, O., Perrier, J., Amziani, R., El Boustani, S., & Moulin, A. (2004). Effect of flavonoids from various Mediterranean plants on enzymatic activity of intestinal carboxylesterase. *Biochimie*, 86(12), 919-925.
- Thuille, N., Fille, M., & Nagl, M. (2003). Bactericidal activity of herbal extracts. *International journal of hygiene and environmental health*, 206(3), 217-221.
- Tillequin, F., Paris, M., Jacquemin, H., & Paris, R. R. (1978). Flavonoids from *Piper marginatum* [leaves]: Isolation of a new flavonoid, the marginatoside. *Plant Medica*. Vol. 33, pp. 46-52.
- Tlili, N., Mejri, H., Lajnef, H. B., Feriani, A., Khaldi, A., & Nasri, N. (2015). Unexploited *Thapsia garganica*, *Orlaya maritima*, and *Retama raetam* seeds: potential sources of unsaturated fatty acid and natural antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 92(8), 1175-1181.
- Tolba, I. (2016). Détermination d'un méta-paramètre pour l'estimation de la capacité antioxydante globale des thés, tisanes et jus (Doctoral dissertation, Université du Québec à Trois-Rivières).
- Tomás-Barberán, F. A., Gil, M. I., Cremin, P., Waterhouse, A. L., Hess-Pierce, B., & Kader, A. A. (2001). HPLC–DAD–ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4748-4760.
- Toure, D. (2015). Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de côte d'ivoire (Doctoral dissertation, Université Felix Houphouët Boigny, Côte d'Ivoire).
- Trabsa, H. (2015). Activité antioxydante et anti-inflammatoire des fractions des plantes médicinales (Doctoral dissertation, Université Ferhat Abbas, Sétif).

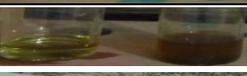
- Urquiaga, I. N. E. S., & Leighton, F. (2000). Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological research*, 33(2), 55-64.
- Valko, M., Rhodes, C. J. B., Moncol, J., Izakovic, M. M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160(1), 1-40.
- Wannes, W. A., Mhamdi, B., Sriti, J., Jemia, M. B., Ouchikh, O., Hamdaoui, G., ... & Marzouk, B. (2010). Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food and chemical toxicology*, 48(5), 1362-1370.
- Watanabe, M., Yamada, M., Mue, S., & Ohuchi, K. (1995). Enhancement by cyclo-oxygenase inhibitors of platelet-activating factor production in thapsigargin-stimulated macrophages. *British journal of pharmacology*, 116(3), 2141-2147.
- Waterman, P. G., & Mole, S. (1994). *Analysis of phenolic plant metabolites*. Oxford: Blackwell Scientific Publications. *Methods in Ecology*.
- Yakhlef, G., Laroui, S., Hambaba, L., Aberkane, M. C., & Ayachi, A. (2011). Évaluation de l'activité antimicrobienne de *Thymus vulgaris* et de *Laurus nobilis*, plantes utilisées en médecine traditionnelle. *Phytothérapie*, 9(4), 209-218.
- Yasmine, B. (2011). *Etude des activités inflammatoire, analgésique, toxiques et antioxydants des extraits de Thapsia garganica»* (Doctoral dissertation, Université Abderrahmane Mira, Béjaïa).
- Yi, H. S., Park, W. H., Lim, S. H., & Moon, J. Y. (2008). Total Phenolic Contents, Radical Scavenging Capacities and Inhibitory Effects on Lipid Peroxidation and LDL Oxidation of *Prunus persica* Branch. *Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine*, 22(5), 1309-1314.
- Zagane, A. (2011). *Synthèse et propriétés biologiques de nouveaux flavonoïdes à base saccharidique*. (Mémoire Magister, Université d'Oran).
- Zeggwagh, A. A., Lahlou, Y., & Bousliman, Y. (2013). Enquête sur les aspects toxicologiques de la phytothérapie utilisée par un herboriste à Fès, Maroc. *The Pan African Medical Journal*, 14.
- Zhang, S. Y., Zheng, C. G., Yan, X. Y., & Tian, W. X. (2008). Low concentration of condensed tannins from catechu significantly inhibits fatty acid synthase and growth of MCF-7 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 371(4), 654-658.
- Zhao, X., Zhang, W., Yin, X., Su, M., Sun, C., Li, X., & Chen, K. (2015). Phenolic composition and antioxidant properties of different peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] cultivars in China. *International journal of molecular sciences*, 16(3), 5762-5778.
- Ziane, L. (2016). *Etude phytochimique et évaluation biologique des extraits organiques des différentes parties de Limonastrum feei – Blombaginaceae – (Mlefet khadem)*. (Doctoral dissertation, université Abou-Bekr Belkaid -Tlemcen).
- Zimmer, N., & Cordesse, R. (1996). Influence des tanins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. *Productions animales*, 9(3), 167-179.



Annexes

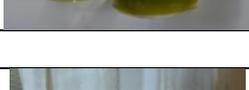
ANNEXE 01 : Résultats de criblage phytochimique

Tableau 01 : Résultats qualitatifs du criblage phytochimique des feuilles de *Thapsia garganica* L.

Phytoconstituants	Extrait utilisé	Solvants et Réactifs	Résultat	Réaction caractéristique
Saponosides	Aqueux	Eau distillée	+	
Tannins	Aqueux	FeCl ₃ (2%)	+	
	Méthanolique		+	
Flavonoïdes	Méthanolique	HCl/ tournures de magnésium (Mg)	+	
Composés réducteurs	aqueux	Liquueur de Fehling	-	
	Méthanolique		-	
Amidon	Aqueux	Réactif d'amidon	-	
Quinones libres	Ethérique	NaOH (0,1N)	-	
Alcaloïdes bases	Ethérique	Réactif Mayer	-	
Emodols		NH ₄ OH	-	
Coumarines		NH ₄ OH (25%)	-	
Stérols et triterpènes	Ethérique	H ₂ SO ₄	+	
	Méthanolique		+	
Terpénoïdes	Ethérique		-	
Acides gras et huiles volatiles	Ethérique	NaOH (2N)	+	
	Méthanolique	Réactifs Mayer/Wagner	+	
Aqueux	-			
Anthracénosides	Méthanolique	NH ₄ OH (10%)	-	
Anthocyanosides		NaOH	-	

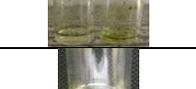
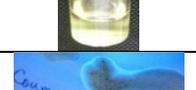
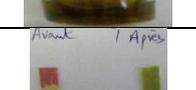
ANNEXE 01 : Résultats de criblage phytochimique

Tableau 02 : Résultats du criblage phytochimique qualitatif des racines de *Thapsia garganica* L.

Phytoconstituants	Extrait utilisé	Solvants et Réactifs	Résultat	Réaction caractéristique
Saponosides	Aqueux	Eau distillée	-	
Tannins	Aqueux	FeCl ₃ (2%)	+	
	Méthanolique		-	
Flavonoïdes	Méthanolique	HCl/ tournures de magnésium (Mg)	-	
Composés réducteurs	aqueux	Liqueur de Fehling	-	
	Méthanolique		+	
Amidon	Aqueux	Réactif d'amidon	+	
-Quinones libres	Ethérique	NaOH (0,1N)	+	
Alcaloïdes bases	Ethérique	Réactif Mayer	-	
Emodols		NH ₄ OH	-	
Coumarines		NH ₄ OH (25%)	+	
Stérols et triterpènes	Ethérique	H ₂ SO ₄	+	
	Méthanolique		+	
Terpénoïdes	Ethérique			+
Acides gras et huiles volatiles	Ethérique	NaOH (2N)	+	
Alcaloïdes sels	Méthanolique	Réactifs Mayer/Wagner	+	
	Aqueux		+	
Anthracénosides	Méthanolique	NH ₄ OH (10%)	-	
Anthocyanosides		NaOH	-	

ANNEXE 01 : Résultats de criblage phytochimique

Tableau 03 : Résultats qualitatifs du criblage phytochimique des feuilles de *Prunus persica* L.

Phytoconstituants	Extrait utilisé	Solvants et Réactifs	Résultat	Réaction caractéristique
Saponosides	Aqueux	Eau distillée	+	
Tannins	Aqueux	FeCl ₃ (2%)	+	
	Méthanolique		+	
Flavonoïdes	Méthanolique	HCl/ tournures de magnésium (Mg)	+	
Composés réducteurs	aqueux	Liqueur de Fehling	-	
	Méthanolique		-	
Amidon	Aqueux	Réactif d'amidon	-	
Quinones libres	Ethérique	NaOH (0,1N)	+	
Alcaloïdes bases	Ethérique	Réactif Mayer	-	
Emodols		NH ₄ OH	-	
Coumarines		NH ₄ OH (25%)	-	
Stérols et triterpènes	Ethérique	H ₂ SO ₄	+	
	Méthanolique		+	
Terpénoïdes	Ethérique		+	
Acides gras et huiles volatiles	Ethérique	NaOH (2N)	+	
Alcaloides sels	Méthanolique	Réactifs Mayer/Wagner	+	
	Aqueux		+	
Anthracénosides	Méthanolique	NH ₄ OH (10%)	-	
Anthocyanosides		NaOH	-	

ANNEXE 02 : Résultats des meilleures séparations CCM et CC

Tableau regroupe les meilleurs résultats des séparations par CCM :

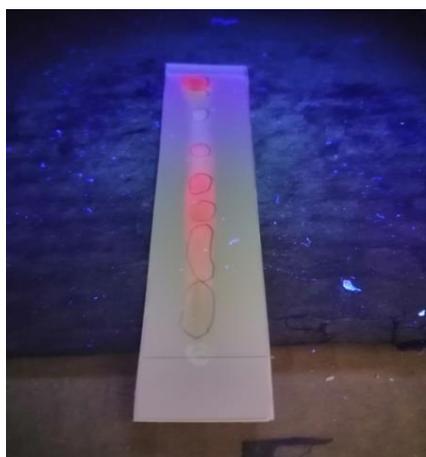
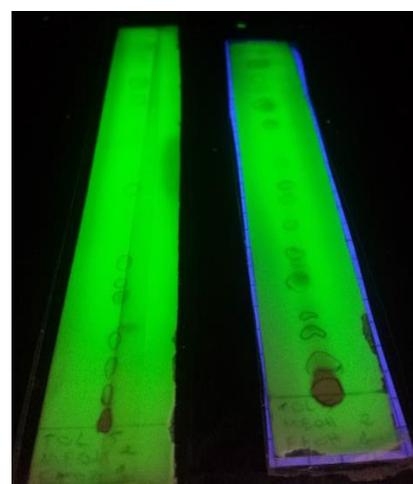
Plante	Extraits	Systèmes utilisés	R _f (cm)	Couleur en 365 nm	Couleur en 254 nm
<i>Thapsia garganica</i> Feuilles	Flavonoïdes Acétate d'éthyle	Acétate d'éthyle Me-OH H ₂ O 7/2/1	0,3	Orange	vert
			0,36	Marron	Marron
			0,42	Rose	vert
			0,52	Marron	Marron
			0,57	Violet	-
			0,75	Bleu	-
			0,78	Marron claire	-
			0,9	Marron claire	-
	Flavonoïdes éther éthylrique	Cyclohexane Acétate d'éthyle 6/4	0,11	Orange	Marron
			0,22	Rose	Marron claire
			0,25	Violet	Marron claire
			0,41	Violet	Marron claire
			0,61	Rose	Marron claire
			0,71	Rose	Marron
			0,87	Bleu	Marron
	Flavonoïdes n- butanol	Toluène Me-OH Et-OH 7/2/1	0,47	Orange	Marron
			0,55	Orange	Marron
			0,67	Viole	-
			0,72	Marron	marron
			0,77	Violet	-
			0,81	Orange	-
			0,84	Rose	-
	Tanins	Hexane Acétate d'éthyle 6/4	0,44	Orange	Marron
			0,5	Orange	Marron
			0,54	Orange	Marron
			0,57	Violet	claire
			0,62	Transe	Claire
			0,64	Violet	Claire
			0,69	Orange	marron
			0,71	Rose	marron
			0,76	Orange	claire
			0,82		marron
Saponosides	Toluène Me-OH Et-OH 7/2/1	0,5	Marron	Marron	
		0,61	marron	Marron	
		0,65	Violet	Marron claire	
		0,68	-	Marron	
		0,77	marron	Marron	

ANNEXE 02 : Résultats des meilleures séparations CCM et CC

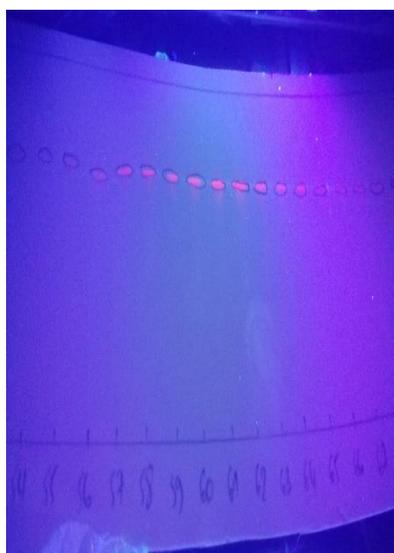
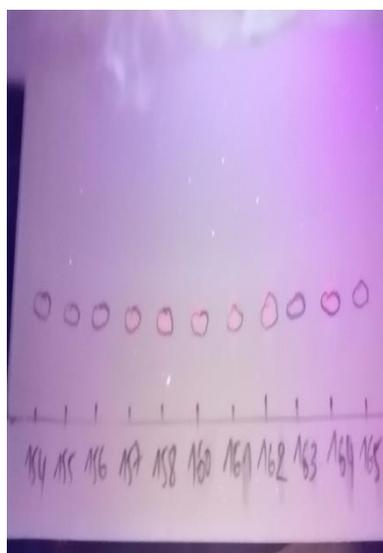
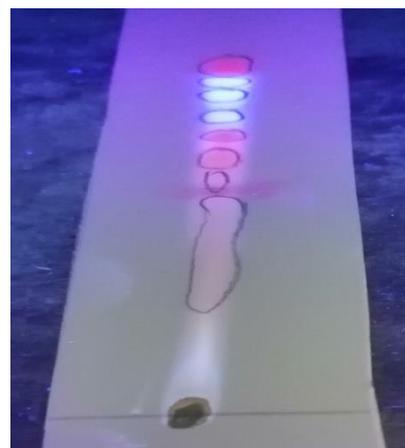
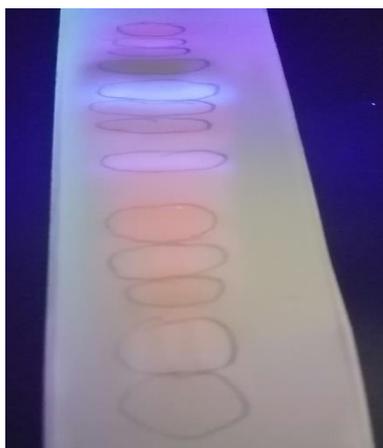
			0,8	Violet	Marron claire
			0,83	-	Marron
			0,85	Rose	-
			0,97	violet	-
	Brut méthanolique	Hexane Acétate d'éthyle 6/4	0,43	Orange	-
			0,54	violet	Marron claire
			0,72	bleu	-
			0,81	Violet	-
			0,84	orange	-
			0,90	orange	Marron claire
<i>Thapsia garganica</i> Racines	Tanins	Toluène Me-OH Et-OH 7/2/1	0,1	violet	-
			0,18	violet	-
			0,31	violet	Marron claire
			0,65	violet	-
			0,68	bleu	-
			0,81	bleu	-
	Saponosides	Toluène Me-OH Et-OH 7/2/1	0,11	violet	-
			0,38	violet	-
			0,52	violet	-
			0,56	-	Marron claire
<i>Prunus persica</i> Feuilles	Flavonoïdes Acétate d'éthyle	Toluène Me-OH Et-OH 7/2/1	0,11	orange	Marron foncé
			0,18	Marron claire	Marron claire
			0,22	Marron claire	Marron claire
			0,25	orange	Marron claire
			0,30	orange	Marron claire
			0,34	orange	Marron claire
			0,82	Marron claire	Marron claire
	Flavonoïdes éther éthylique	Hexane Acétate d'éthyle 6/4	0,07	orange	-
			0,12	orange	-
			0,15	rose	Marron claire
			0,21	Bleu	-
			0,35	orange	Marron claire
			0,43	orange	-
	Flavonoïdes n- butanol	Chloroforme Me-OH 8/2	0,18	Marron claire	-
0,32			Marron claire	-	
0,47			Marron claire	-	
0,61			Marron claire	-	

ANNEXE 02 : Résultats des meilleures séparations CCM et CC

	Tanins	Chloroforme	0,35	marron	marron
		Me-OH	0,53	marron	marron
		8/2	0,64	marron	marron
	Saponosides	Cyclohexane Acétate d'éthyle 6/4	0,5	Marron claire	Marron foncé
			0,56	Bleu	Marron claire
			0,63	Bleu	Marron claire
			0,68	Vert	Marron claire
			0,75	Vert	Marron claire
			0,90	Bleu	Marron claire

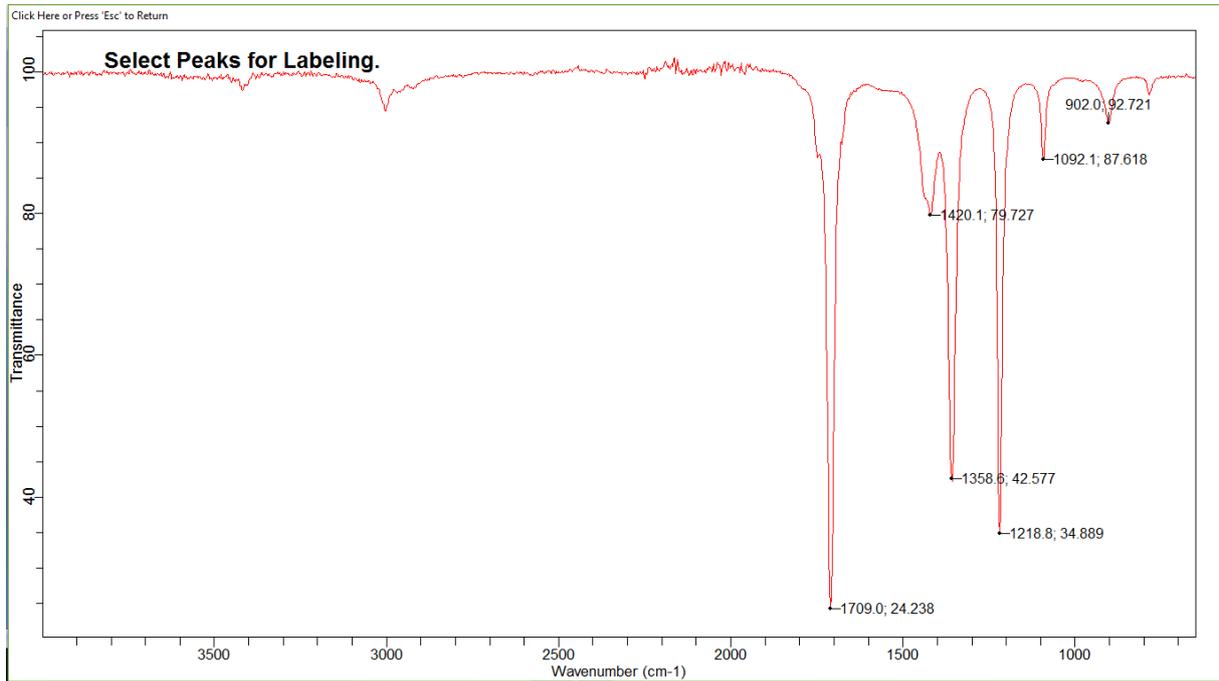


ANNEXE 02 : Résultats des meilleures séparations CCM et CC

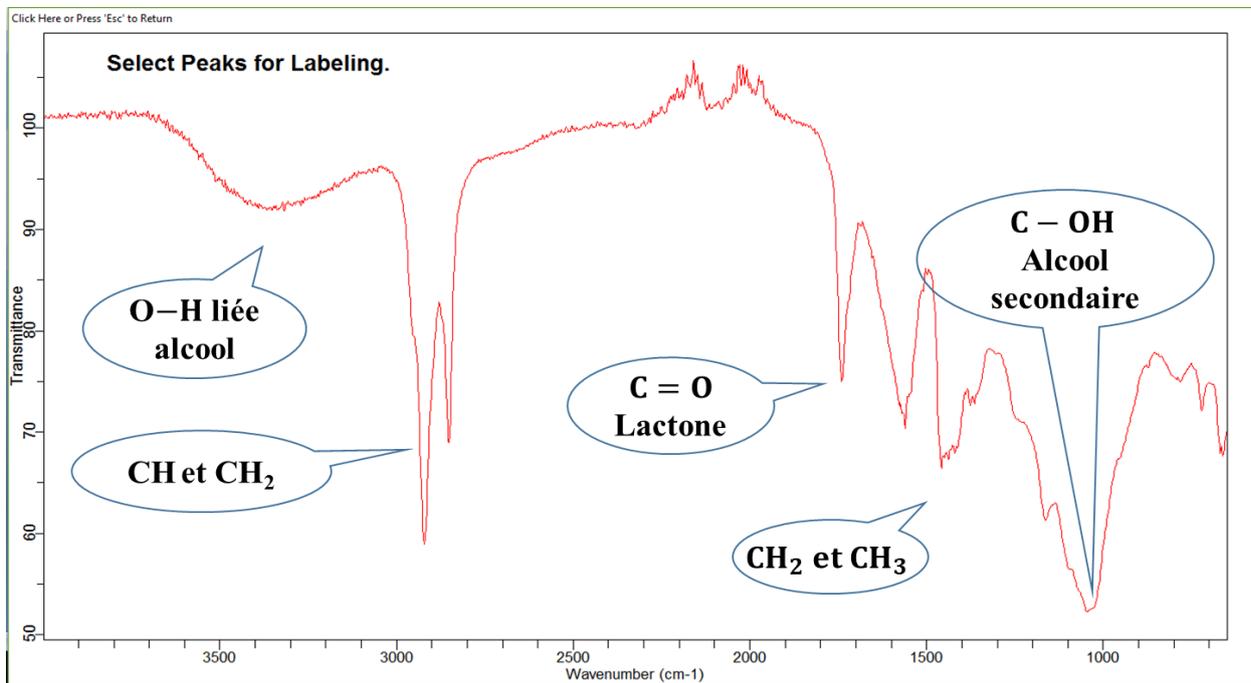


ANNEXE 03 : Les spectres IR des fractions séparées

Solvant (Acétone)

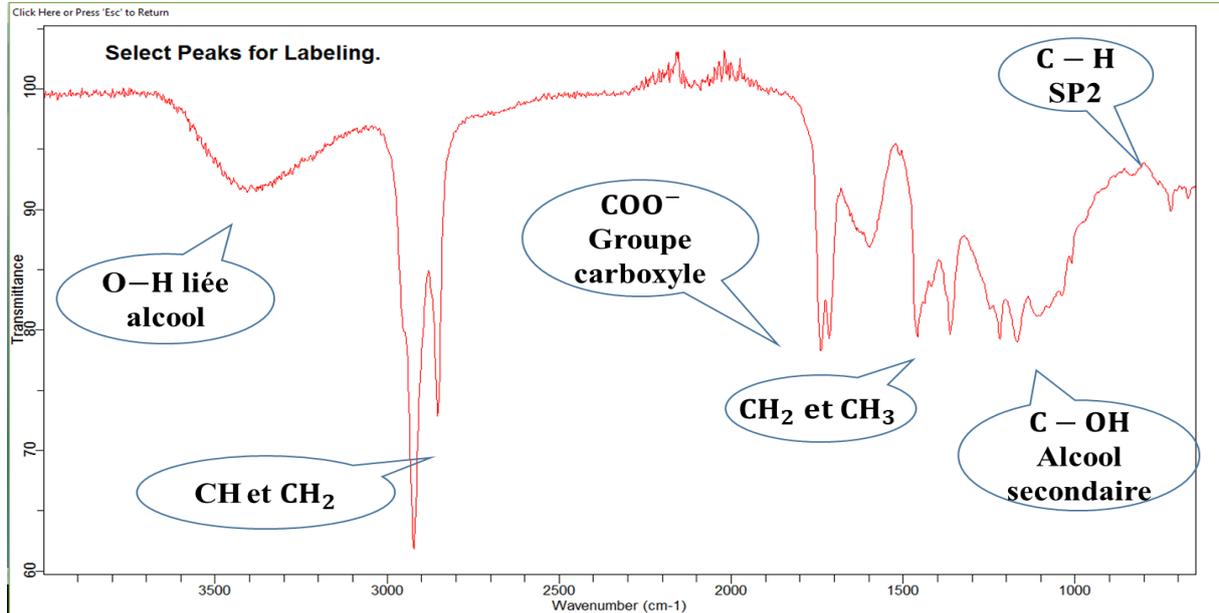


Composé TGAE1

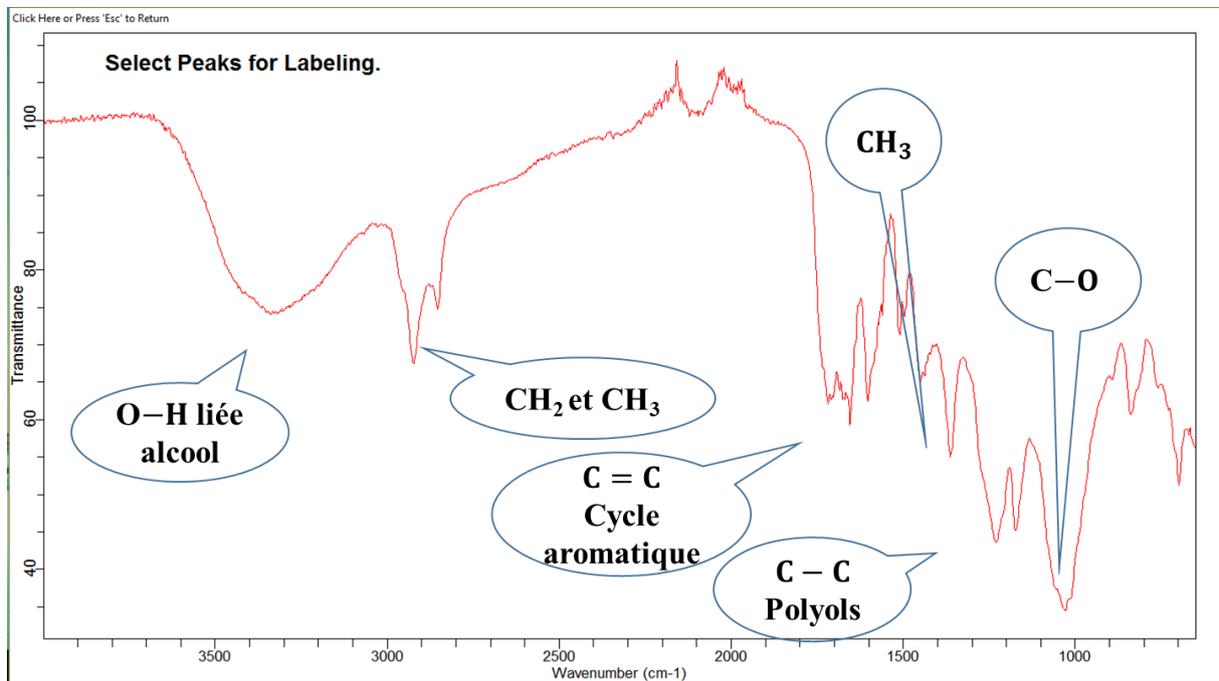


ANNEXE 03 : Les spectres IR des fractions séparées

Composé TGAE2

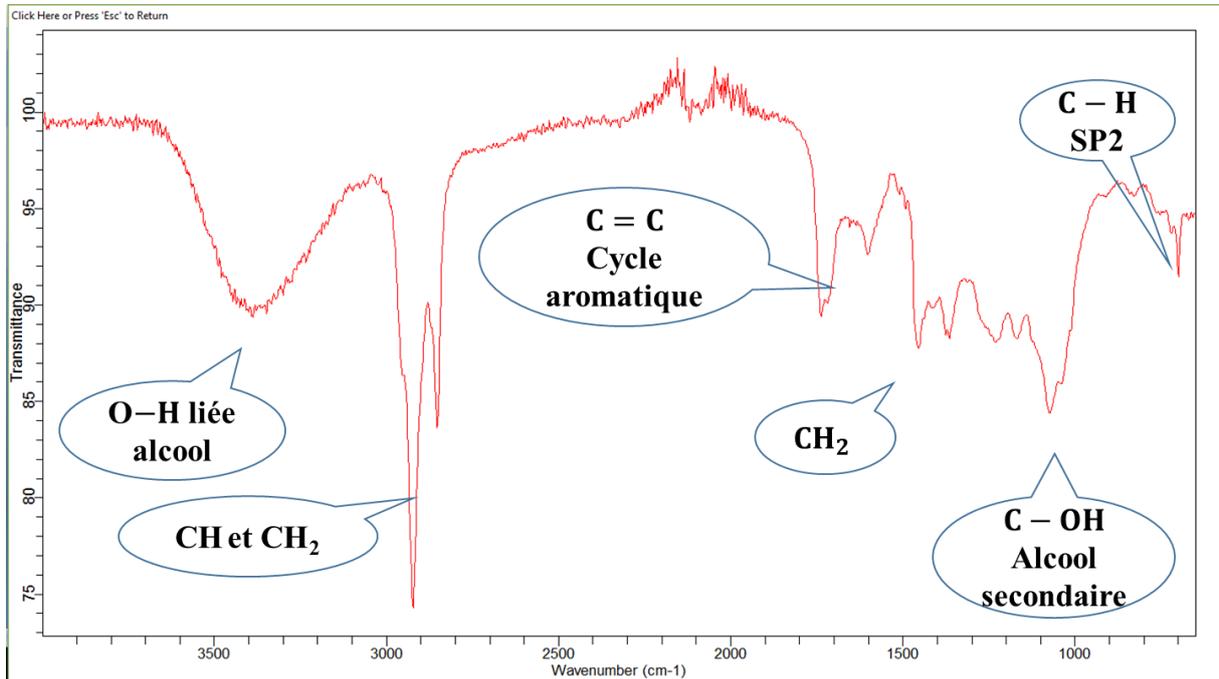


Composé PPAE4

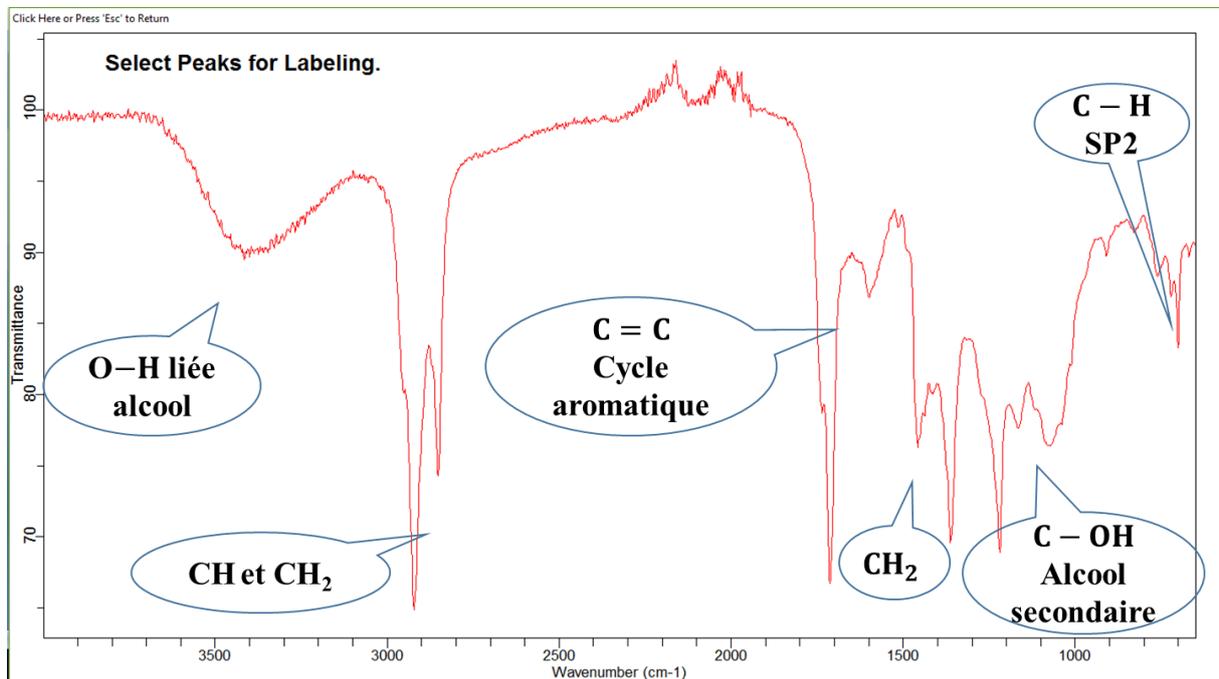


ANNEXE 03 : Les spectres IR des fractions séparées

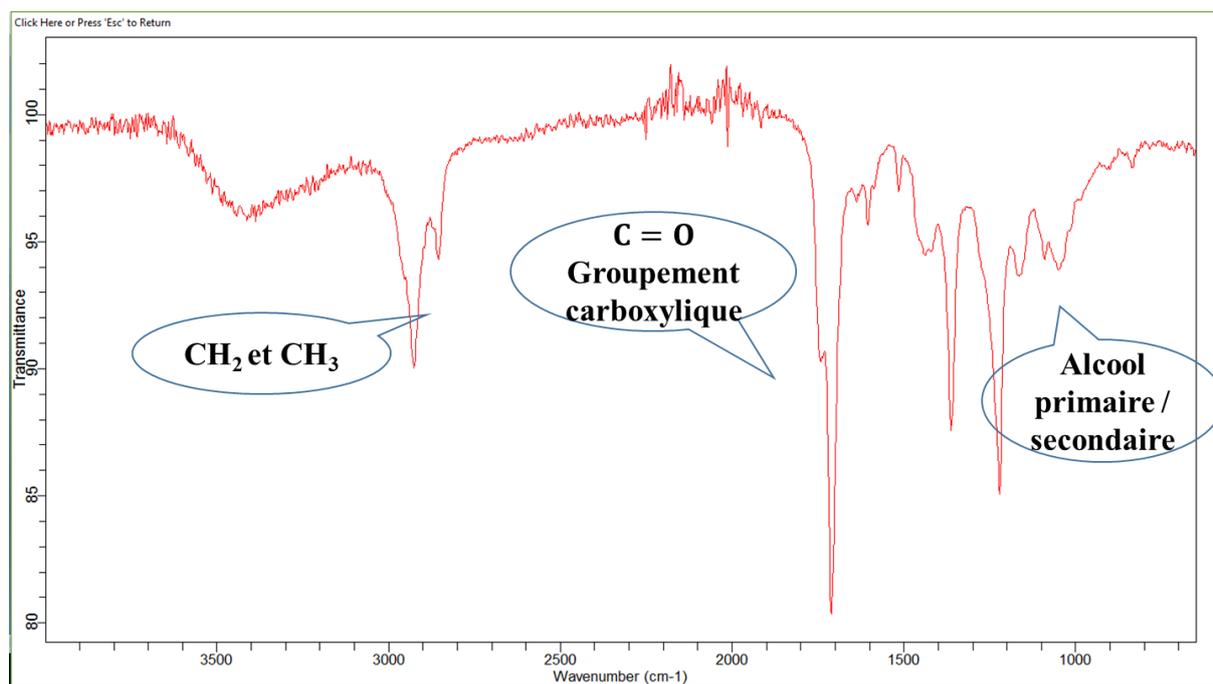
Composé PPAE6



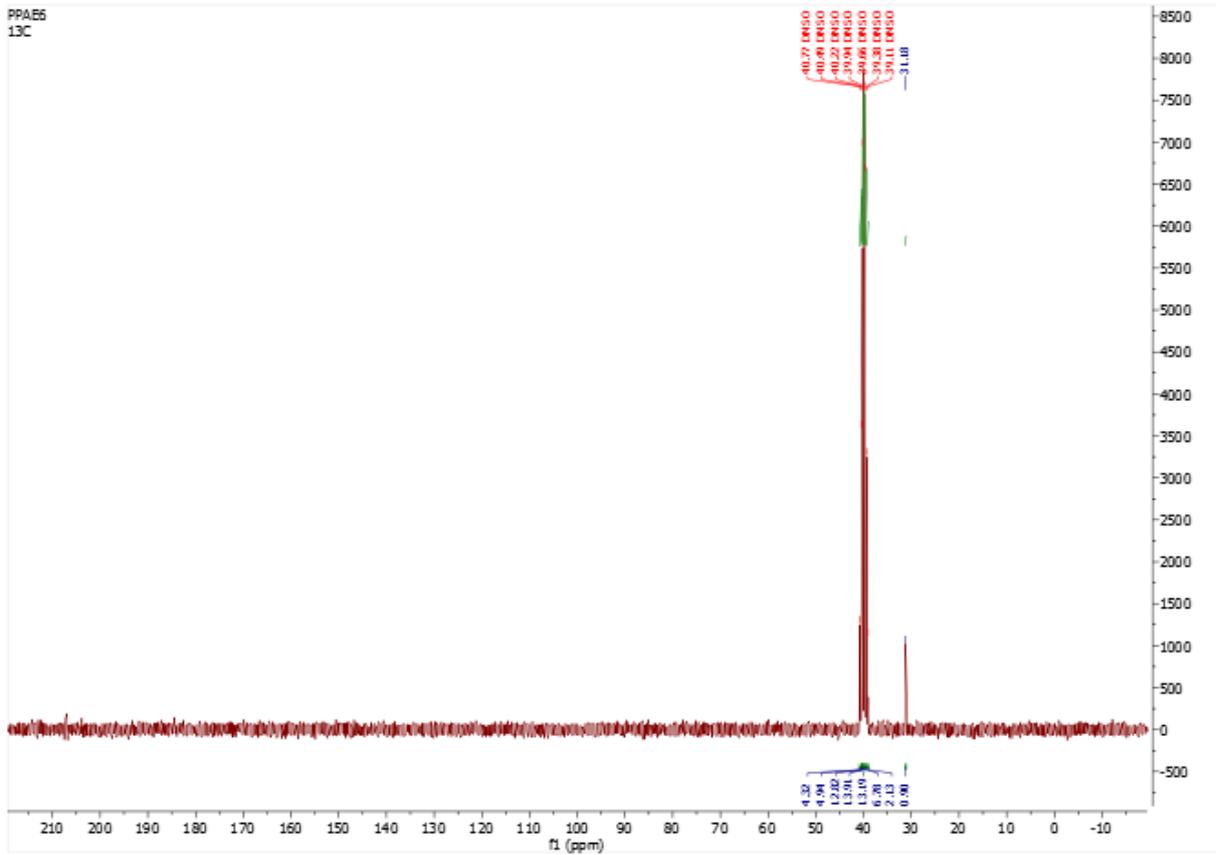
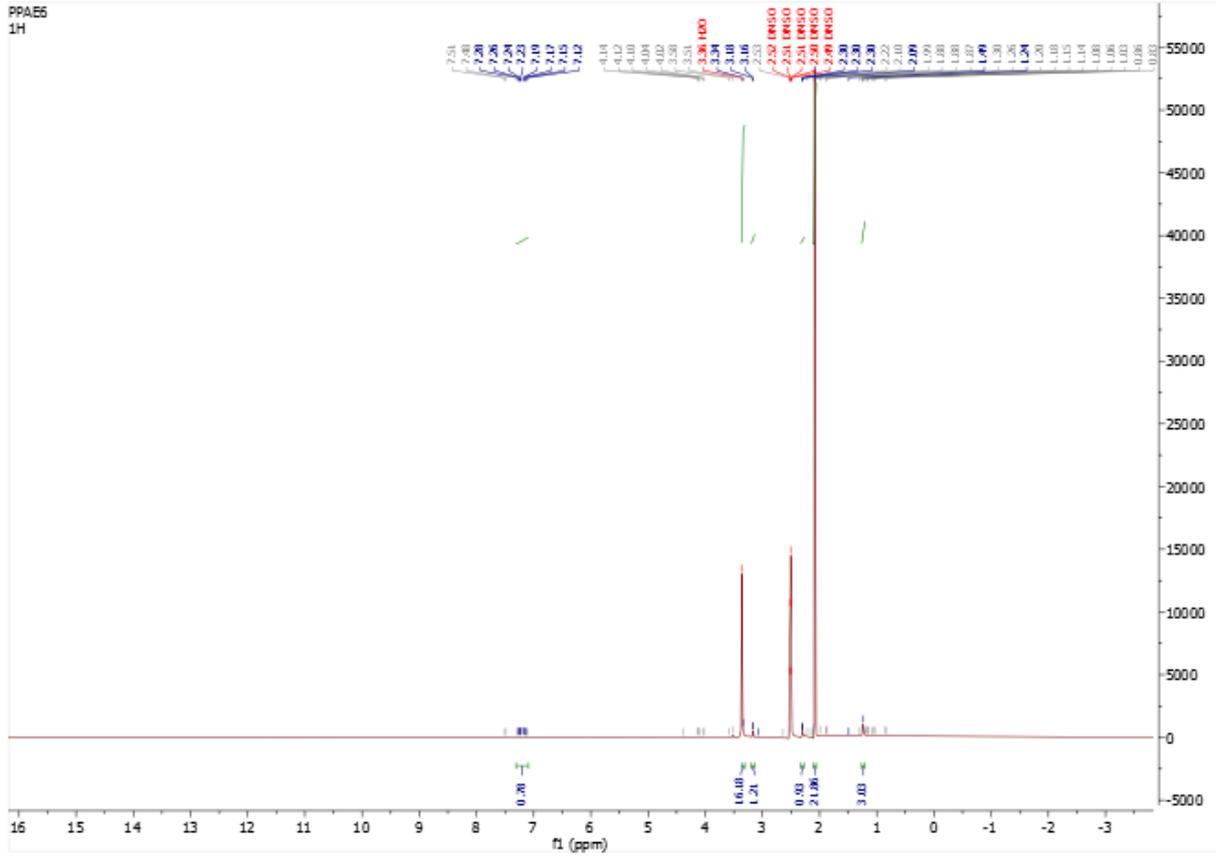
Composé PPAE8



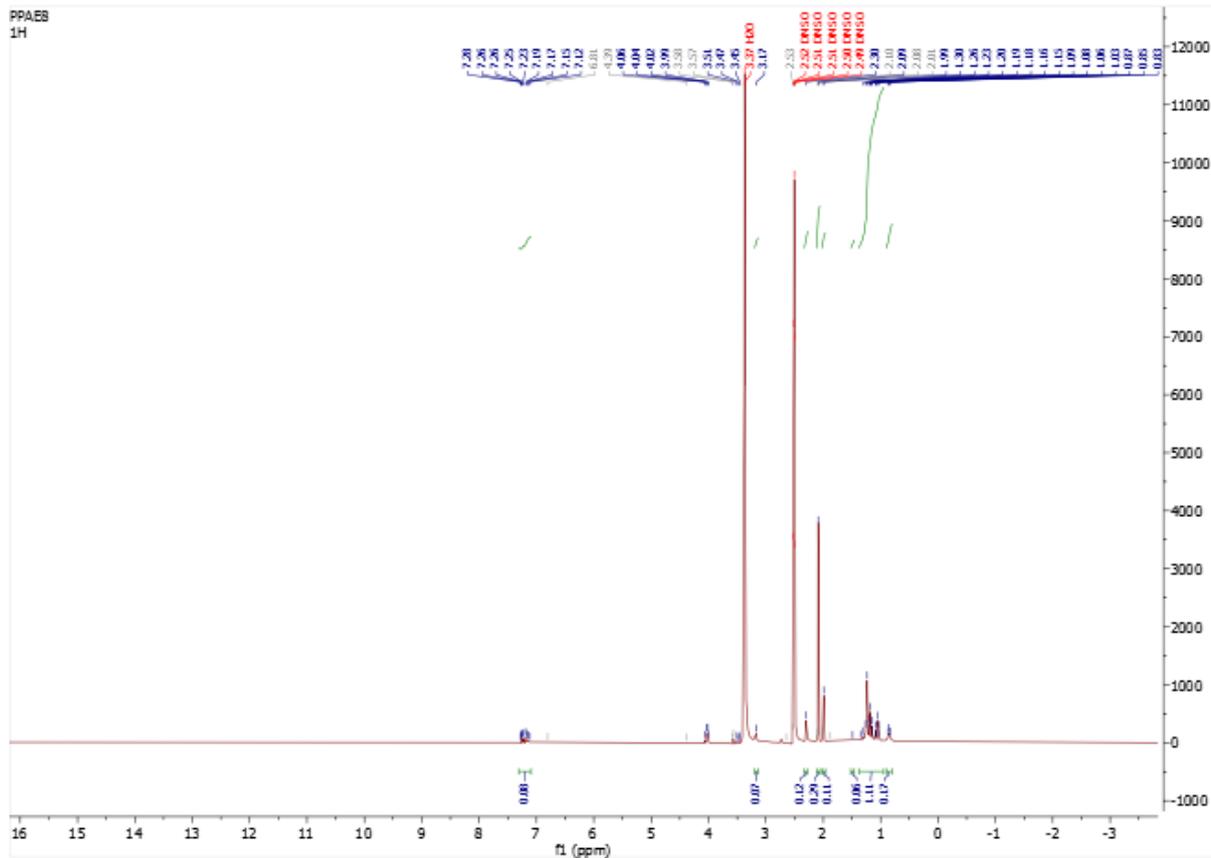
Composé PPEE3



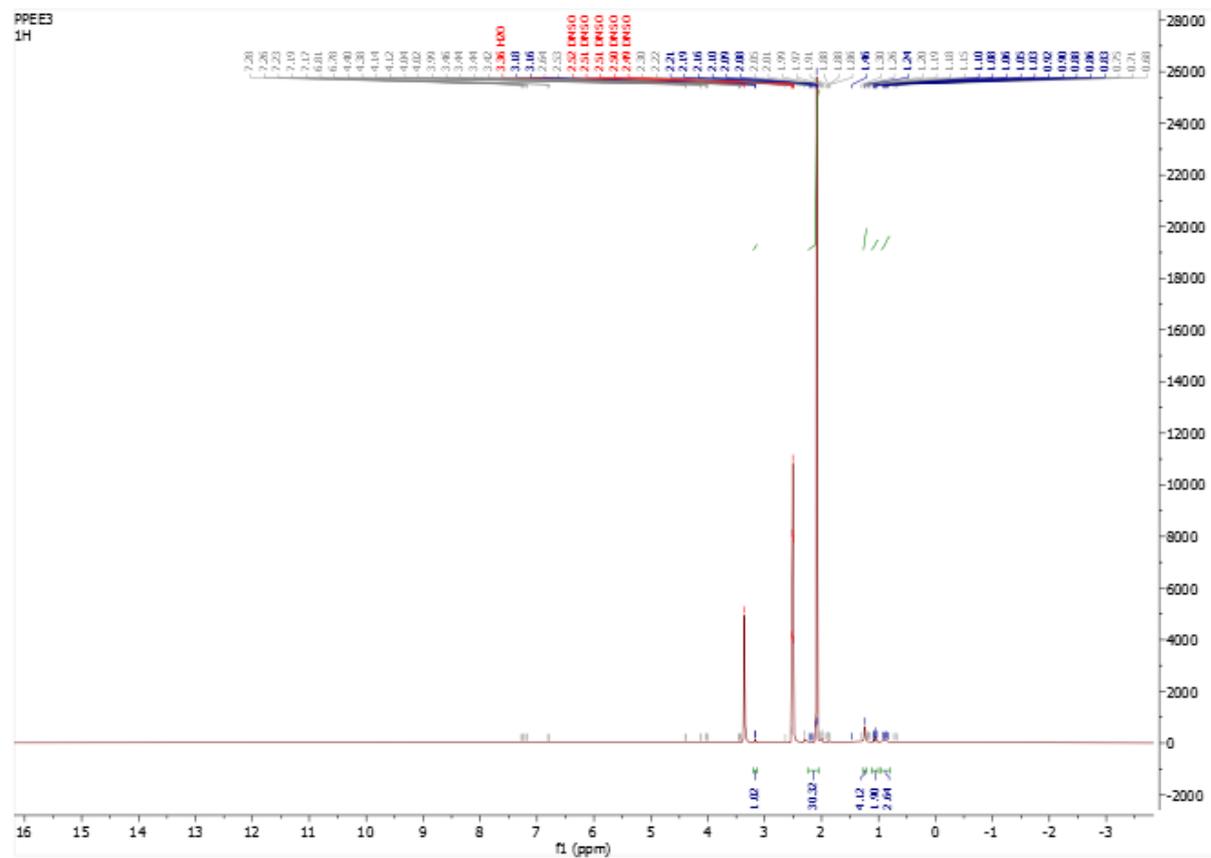
PPAE6



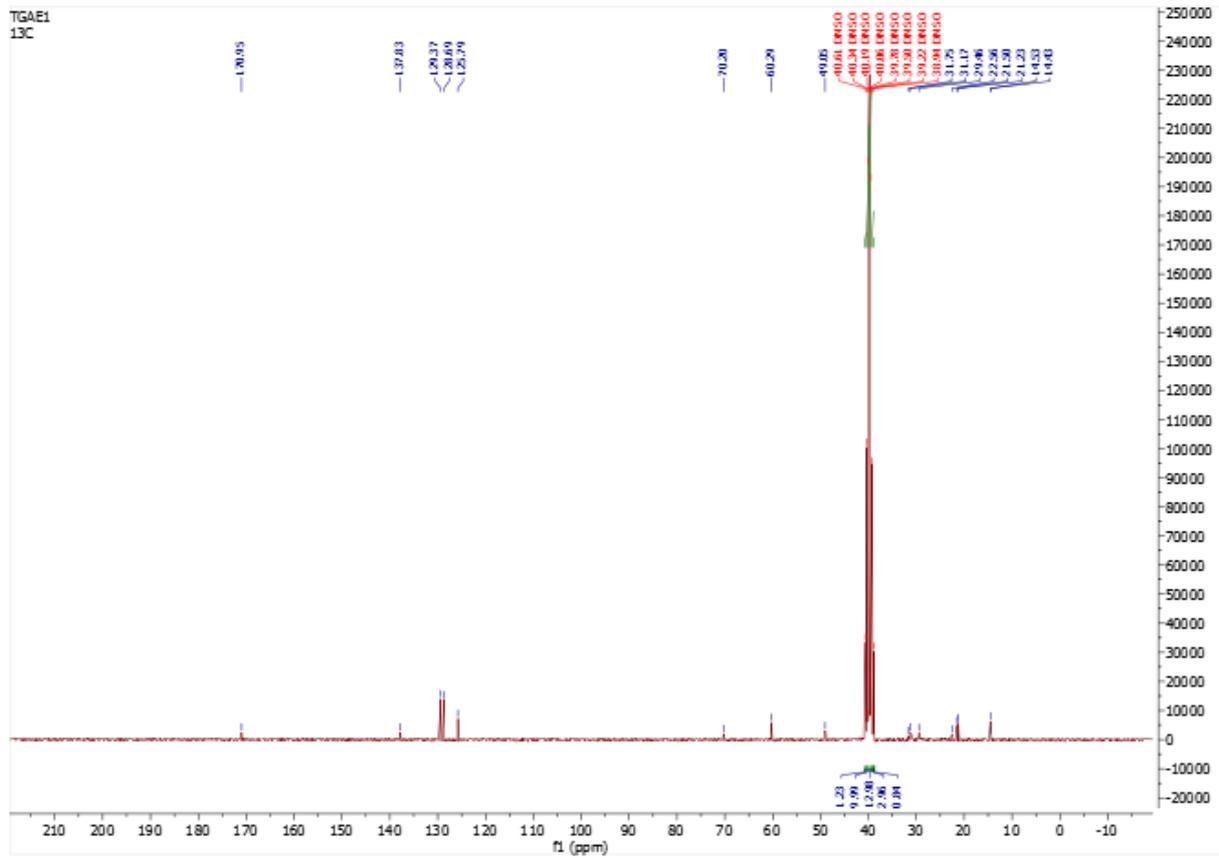
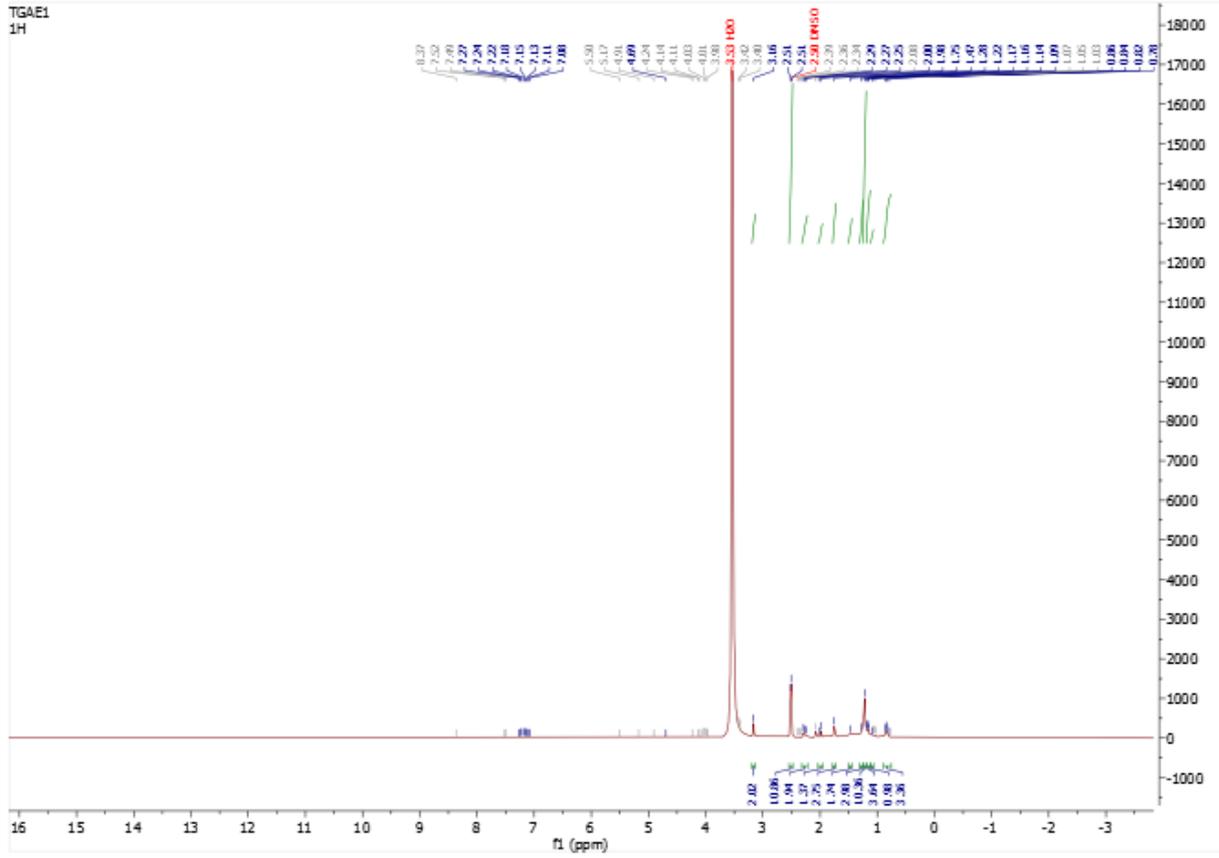
PPAE8



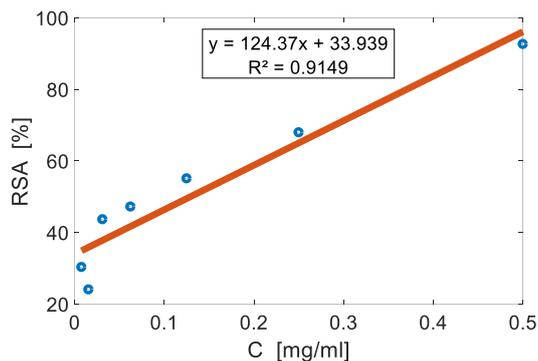
PPEE3



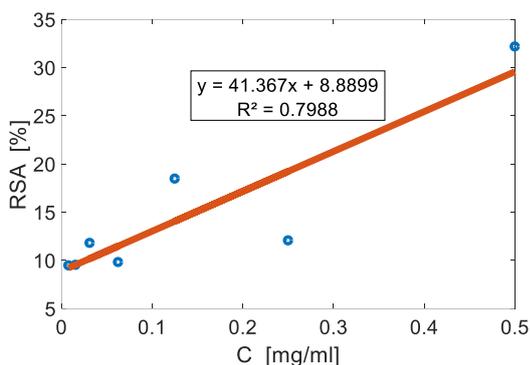
TGAE1



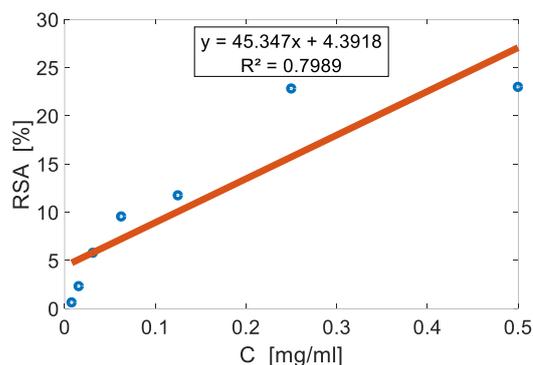
ANNEXE 05 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des différentes concentrations



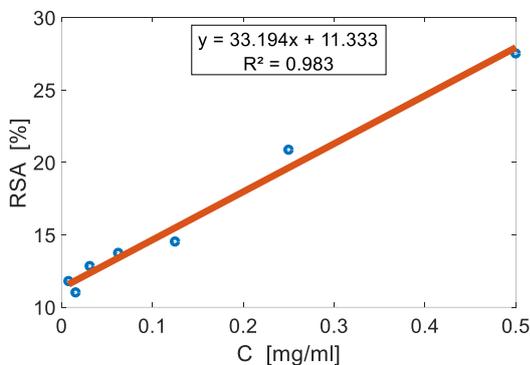
Acide ascorbique



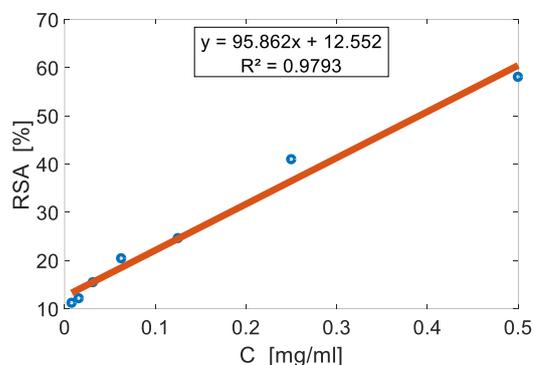
E. M (PP)



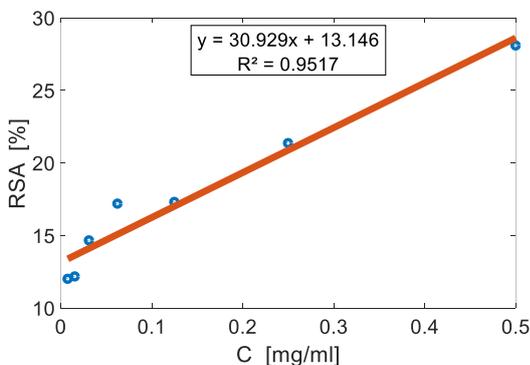
E.F.A.E (PP)



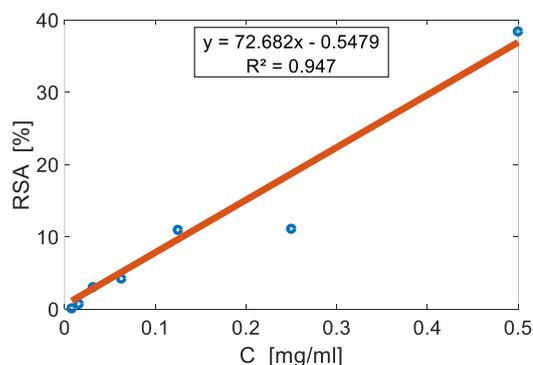
E.F.E.E (PP)



E.F.B (PP)

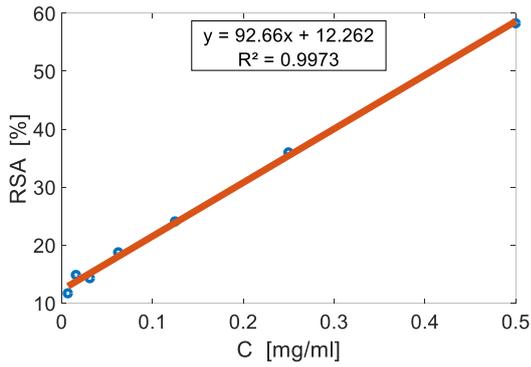


E.T (PP)

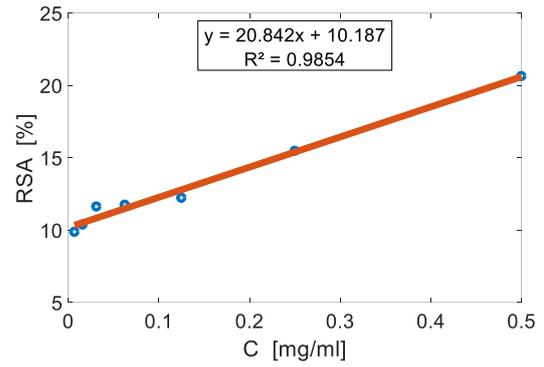


E.S (PP)

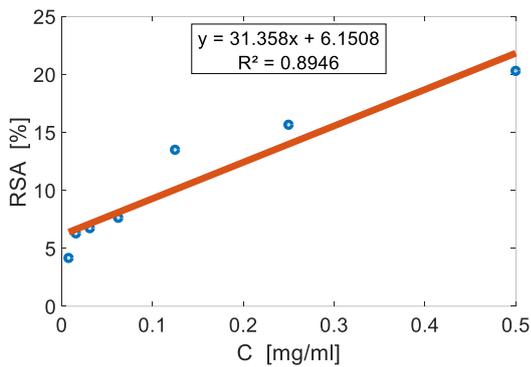
ANNEXE 05 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des différentes concentrations



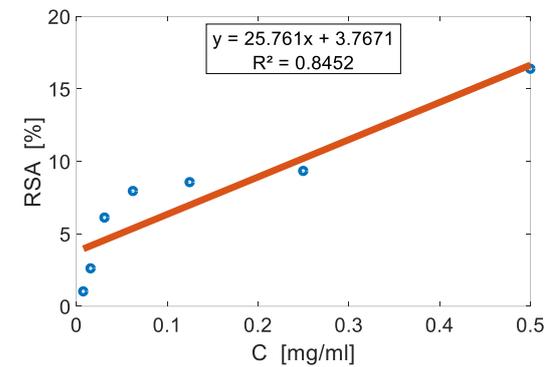
E.M.F (TG)



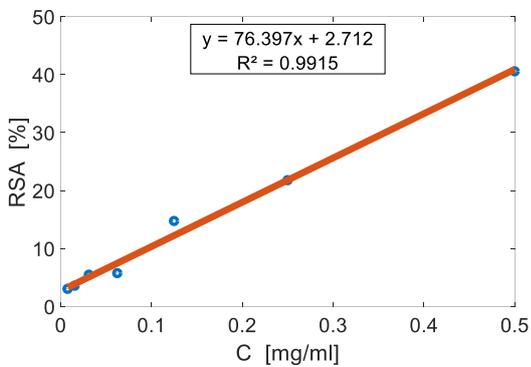
E.M.R (TG)



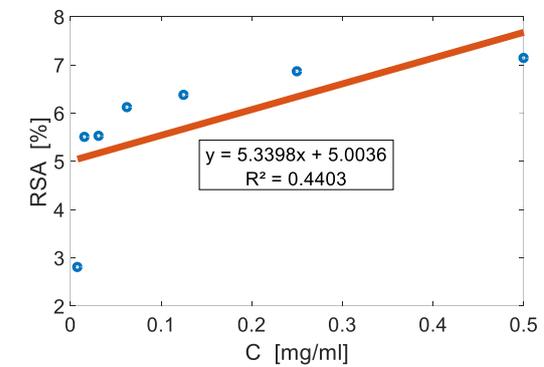
E.T.F (TG)



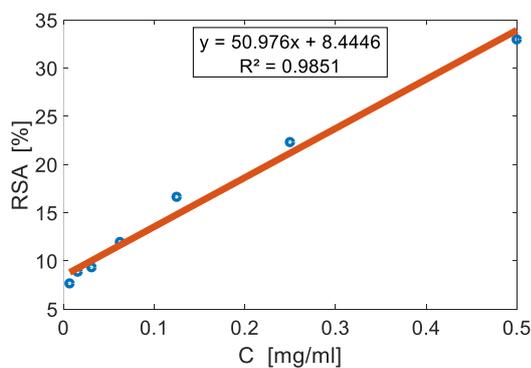
E.T.R (TG)



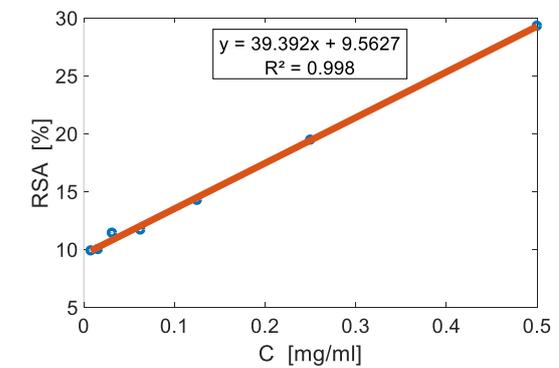
E.S.F (TG)



E.S.R (TG)



E.F (TG)



E.A.R (TG)

ANNEXE 06 : Paramètres caractéristiques de la cinétique de réduction du DPPH•

Tableau : Paramètres caractéristiques de la cinétique de réduction du DPPH• des extraits
Testés de la plante *Thapsia garganica*.

C (mg/ml)	Temps d'équilibre (min)							% DPPH restant						
	F. EA	F. EE	F. B	T. R	T. F	M. R	M. F	F. EA	F. EE	F. B	T. R	T. F	M. R	M. F
0.125	8.3	8.3	8	8.3	4	8.3	5	18.06	57.94	13.54	57.69	12.56	188.24	15.73
0.0625	7	6	7	4	5	4	4.3	23.50	510.59	24.29	87.93	10.95	92.00	17.70
0.0312	5	3.6	8	7.3	5	5	5	69.73	63.17	13.96	57.27	13.11	61.19	17.36
0.0156	6	5	7.3	3	3	4	5	22.85	71.92	24.75	89.49	15.32	81.59	19.10
0.0078	5	5	5.3	4	3	4	4	31.78	80.06	14.39	65.27	17.09	56.26	21.20
0.039	5	5	5	4	3	3	3	23.47	67.71	23.58	87.75	17.13	83.11	20.41

Tableau : Paramètres caractéristiques de la cinétique de réduction du DPPH• des extraits
Testés de la plante *Prunus persica*.

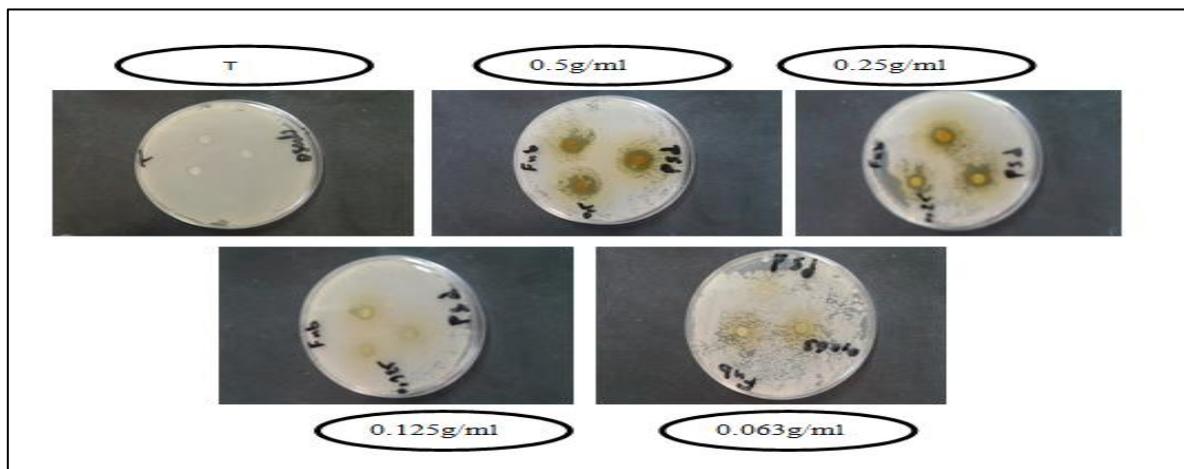
Concentration (mg/ml)	Temps d'équilibre (min)					Temps ½ (min)					% DPPH restant				
	EE	EA	EB	ET	EM	EE	EA	EB	ET	EM	EE	EA	EB	ET	EM
0.125	9	10.3	6	6.3	7	4.6	4.6	3.6	4.3	6.5	8,32	6,81	10,66	10,31	10,67
0.0625	9.3	10.3	8.3	7.3	6	0.3	0.4	0.5	0.3	0.7	8,05	6,81	7,71	8,90	12,45
0.0312	10	9	6	5	4	0,4	0.1	0.5	0,1	0,2	7,49	7,8	10,66	13	18,67
0.0156	9.3	9	6.3	4	4	0.9	0.5	0.6	0.2	0.8	8,05	7,8	10,15	16,25	18,67
0.0078	9	6	5	3.3	3	1.6	0.5	0.4	0.8	0,3	8,32	11,7	12,8	19,69	24,9
0.039	6	6	4.3	5	3	2,0	1,0	0.7	0.2	1,0	12,48	11,7	14,88	13	24,9

ANNEXE 07 : Résultats des tests de confirmation des souches bactériennes

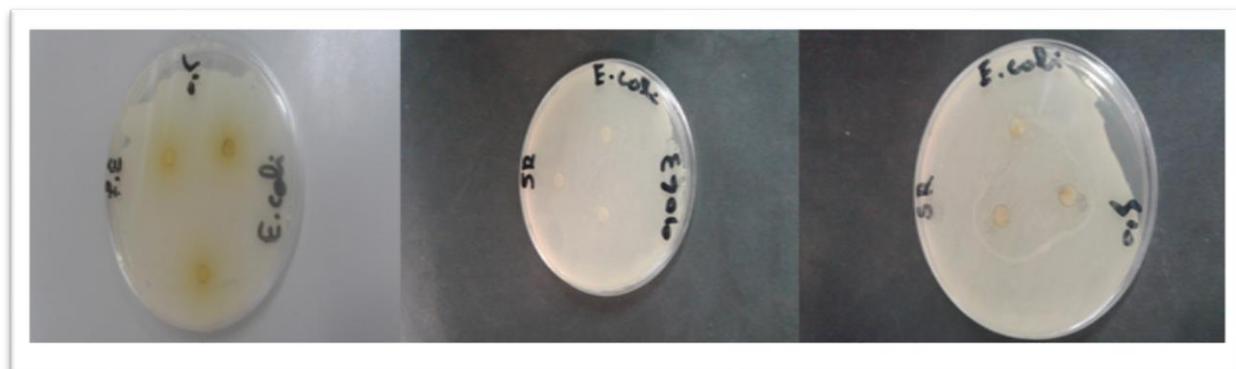
Souches bactériennes	Morphologie	Gram	Test catalase	Type respiratoire	Mobilité
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	Bacille	-	+	Aérobie strict	Mobile
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	Coco bacille	-	-	Aéroanaérobie facultatif	Mobile
<i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC 700603	Bacille	-	+	Aéroanaérobie facultatif	Immobile
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	Bacille	-	-	Aéroanaérobie facultatif	Mobile
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	Cocci en amas	+	+	Aéroanaérobie facultatif	Immobile
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	Coques courtes chaînes	+	-	Anaérobie facultatif	Immobile
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	Bacille	+	+	Aérobie strict	Mobile

ANNEXE 08 : Résultats de L'activité antimicrobienne et l'antibiogramme

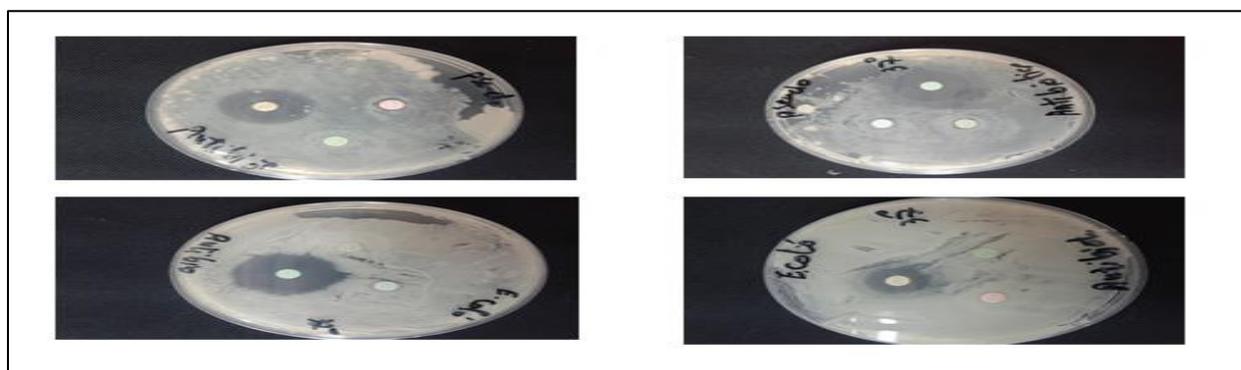
Activité antibactérienne de l'extrait flavonoïde n-butanol de *Thapsia garganica* L contre la souche *P. aeruginosa*.



Résultats de l'activité antibactérienne des extraits de *Thapsia garganica* L contre la souche *E-coli*

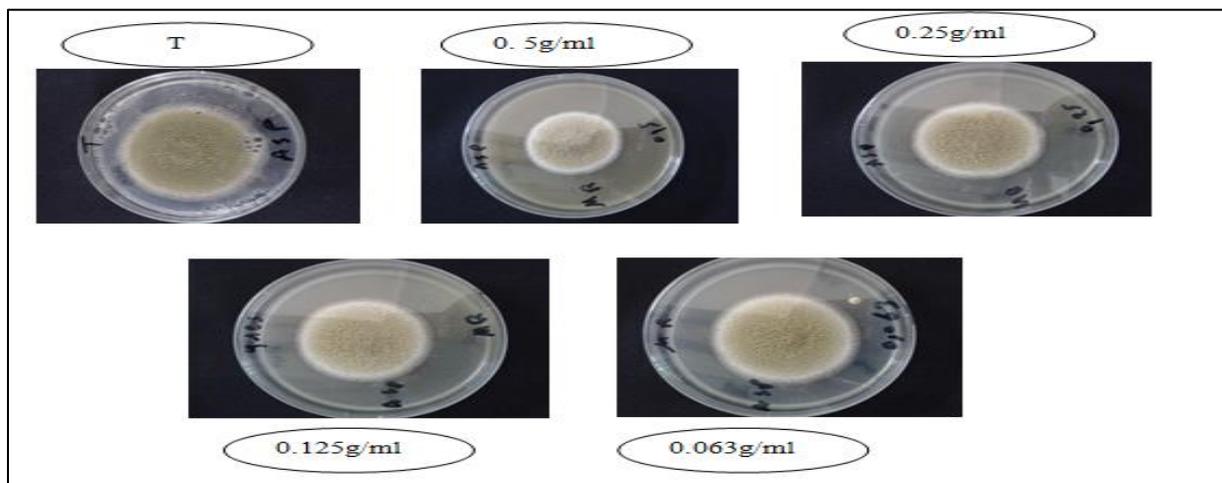


Résultats de test des antibiotiques

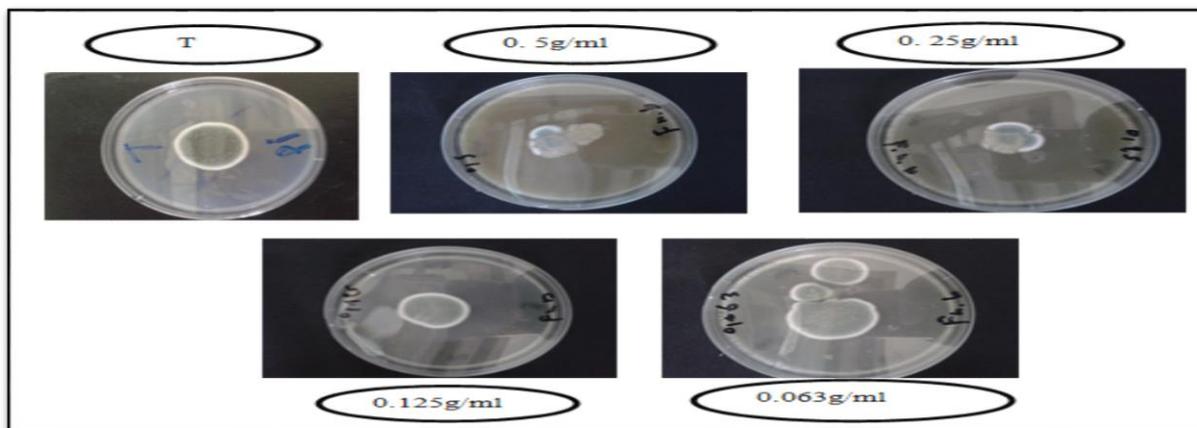


ANNEXE 08 : Résultats de L'activité antimicrobienne et l'antibiogramme

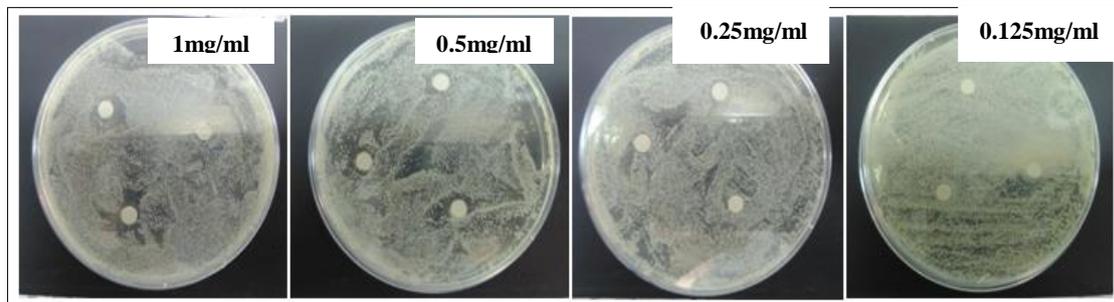
Activité antifongique de l'extrait méthanolique brut racine de *Thapsia garganica L* sur
l'Aspargillus flavus



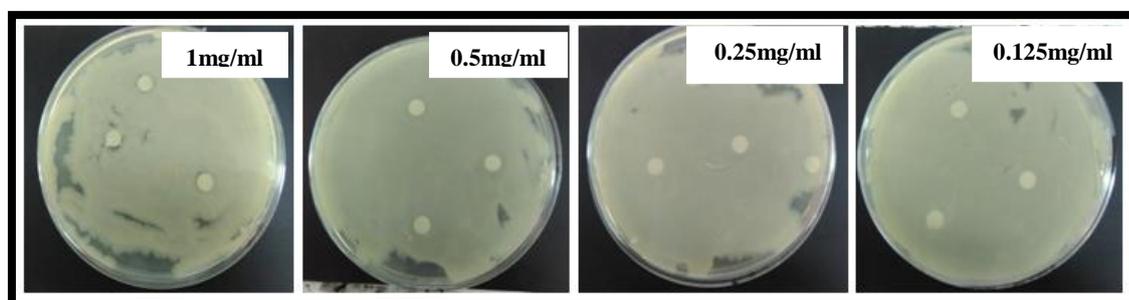
Activité antifongique de l'extrait des flavonoïdes n-butanolique de *Thapsia garganica L*
contre *Penicillium purpurogenum*



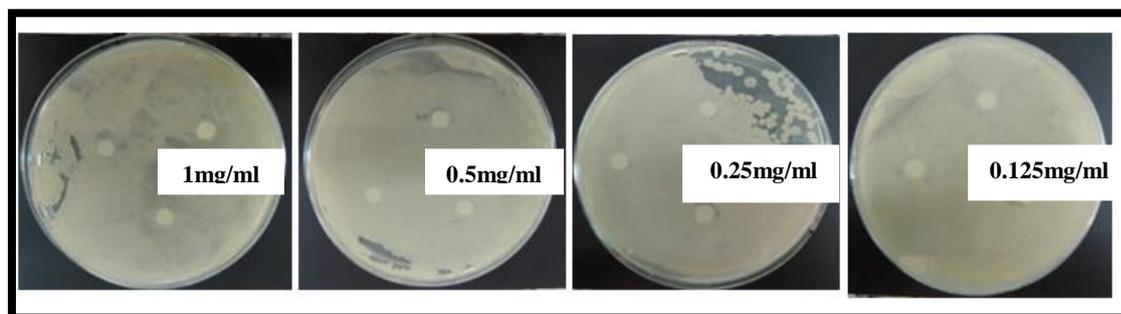
Résultats de l'activité antimicrobienne d'huile essentielle de *Thapsia garganica*



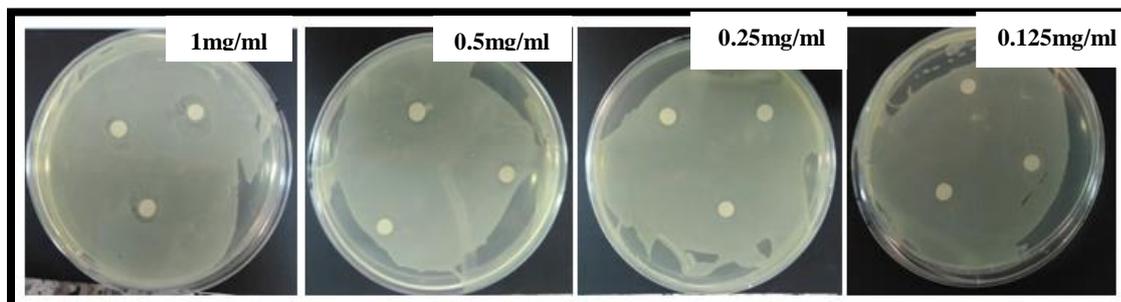
Souche *Staphylococcus aureus*



Souche *Bacillus cereus*

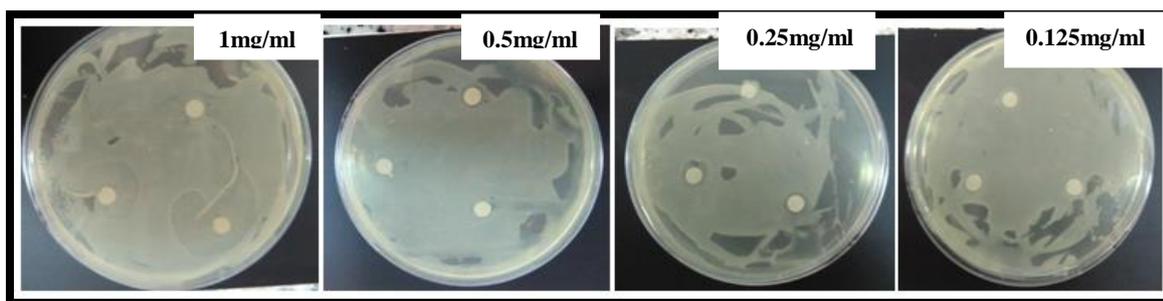


Souche *Citobacter freundii*



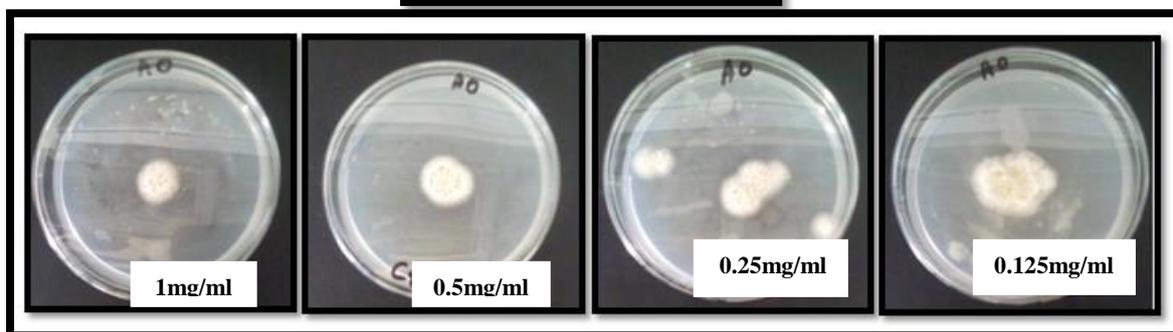
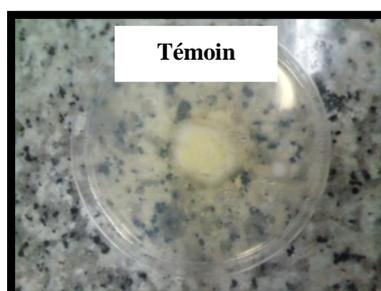
Souche *Enterococcus faecalis*

ANNEXE 08 : Résultats de L'activité antimicrobienne et l'antibiogramme



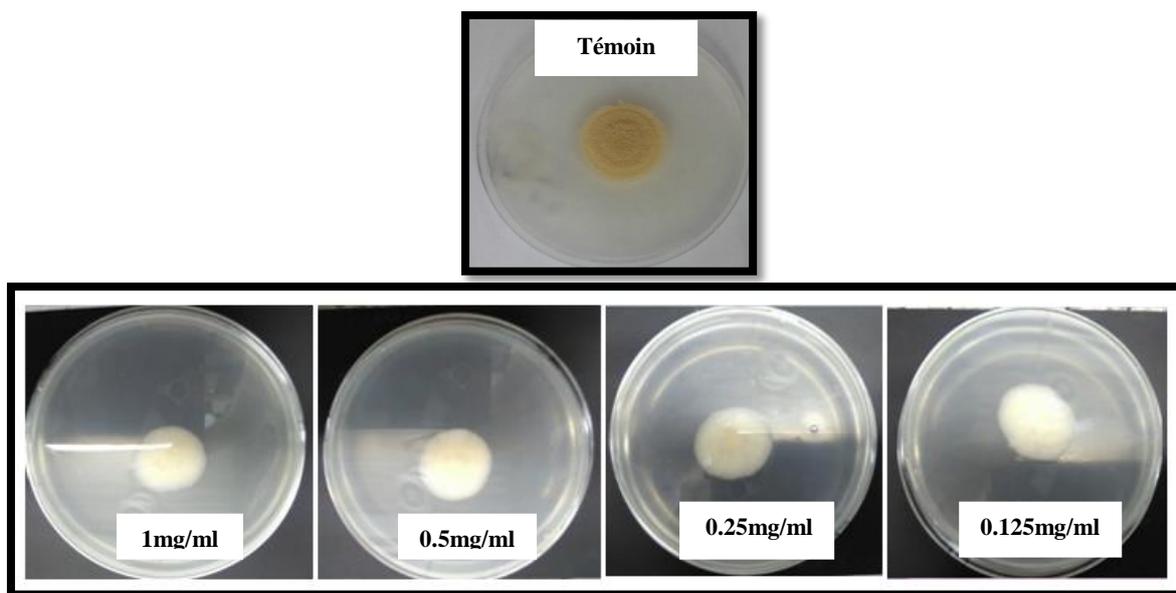
Souche *Salmonella typhimurium*

Résultats de l'activité antifongique d'huile essentielle de *Thapsia garganica*



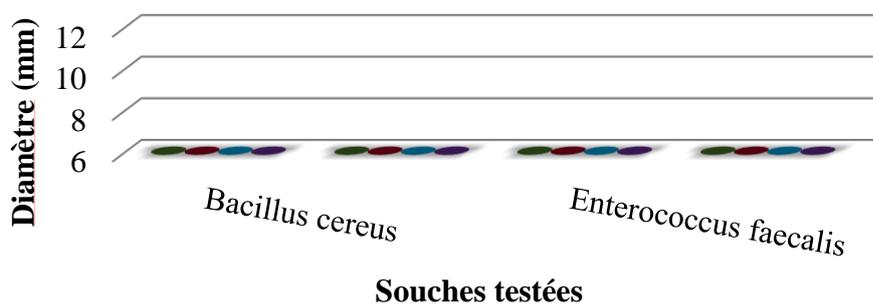
Souche *Penicillium purpurogenum*

ANNEXE 08 : Résultats de L'activité antimicrobienne et l'antibiogramme



Souche *Aspergillus Flavus*

Activité antibactérienne des différents extraits de la plante *Prunus persica*.

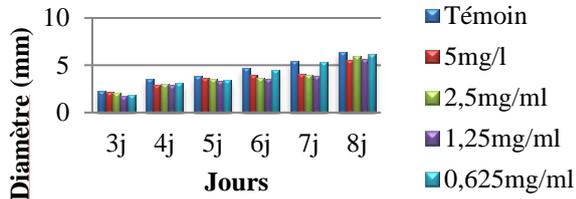


■ 5mg/ml ■ 2,5mg/ml ■ 1,25mg/ml ■ 0,625mg/ml

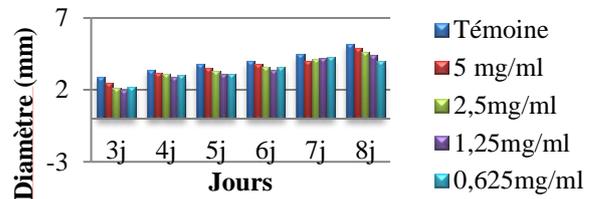
Activité antifongique des différents extraits de la plante *Prunus persica*.

L'extrait méthanolique

Aspergillus flavus

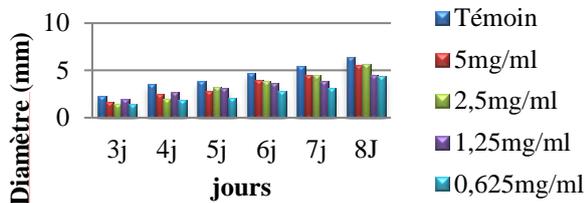


Penicillium Purpurogenum

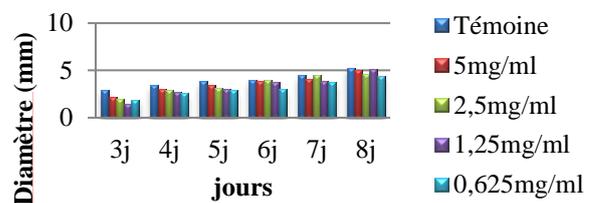


L'extrait acétate d'éthyle

Aspergillus flavus

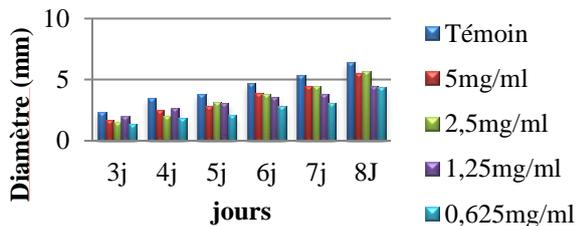


Penicillium Purpurogenum

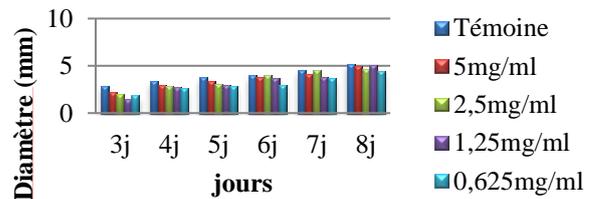


L'extrait éther diétherique

Aspergillus flavus

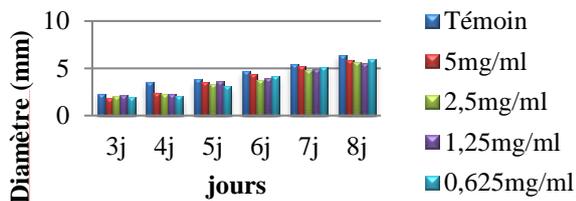


Penicillium Purpurogenum

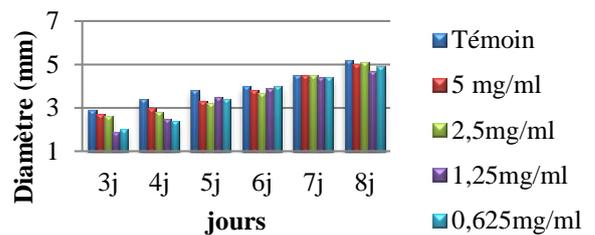


L'extrait butanolique

Aspergillus flavus

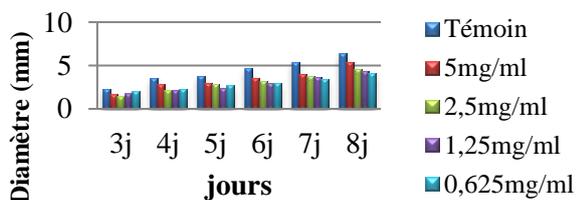


Penicillium Purpurogenum

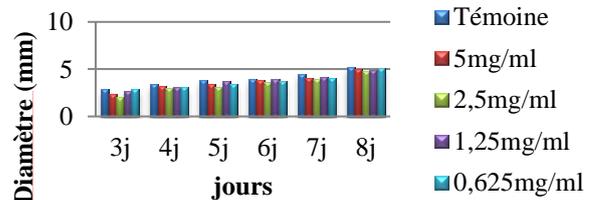


L'extrait saponosides

Aspergillus flavus

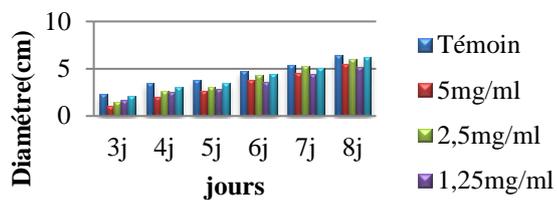


Penicillium Purpurogenum

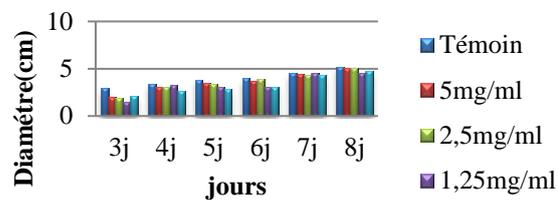


L'extrait tanins

Aspergillus flavus



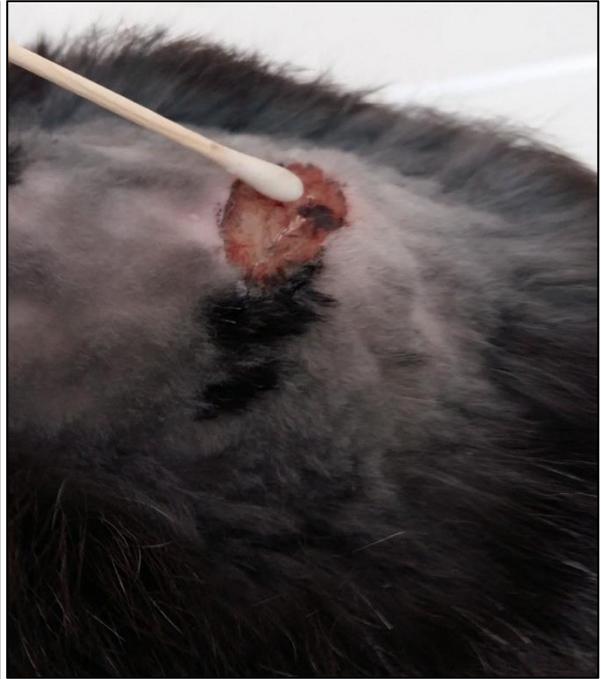
Penicillium Purpurogenum



ANNEXE 09 : Expériences réalisées de l'activité antibactérienne in-vivo



ANNEXE 09 : Expériences réalisées de l'activité antibactérienne in-vivo





Publications et Communications

Les travaux réalisés dans de ce projet de thèse ont fait l'objet d'une publication internationale et des communications dans des manifestations scientifiques nationales et internationales :

Publication :

Aici Djahida, Benmehdi Houcine (2021). Phytochemical Content, Antioxidant and Antimicrobial Effects of *Thapsia garganica* L. Leaves and Roots Grown Wild in Northwest Algeria Indian Journal of Agricultural Research, Volume 55 Issue 5: 519 – 526.

Communications:

- **D. Aici.** Antioxydant activity of different extracts from leaves of *Prunus persica* (L.) endemic to SW of Algeria. The 3rd International Congress of Plant Diversity. 09- 11 Octobre 2015. Marrakech, Maroc.
- **D. Aici.** Activité antibactérienne des différents extraits de la plante *Thapsia garganica* (L.) provenant de la région de Saida. 21ème Journées Nationales de Microbiologie. 08-09 Novembre 2015. Béchar, Algérie.
- **D. Aici.** Etude de l'effet antibactérien des différents extraits des racines de *Thapsia garganica* (L.) vis-à-vis quatre souches bactériennes. 3ème Journée Scientifique des Géosciences de l'Environnement. 10 Mars 2016. Saida, Algérie.
- **D. Aici.** Antioxydant activity of different extracts of *Prunus persica* (L.) using the FRAP essay. Journées Internationales de Biotechnologie (JIB 2016). 18-22 Decembre 2016. Sousse, Tunisie.
- **D. Aici.** Antioxydant activity of different extract from roots of *Thapsia garganica* (L.) endemic to west of Algeria. Premier Séminaire National en Biologie. 10 -11 Avril 2017. Naama, Algérie.
- **D. Aici.** The ferric reducing antioxidant power of different extracts from leaves of *Thapsia garganica* (L.) harvested in the west of Algeria. Second International Seminar of Biology (2nd SIB – VAZB) Valorization of Arid Zone Bioresources, 10 – 11 Décembre 2017. Béchar, Algeria.



Phytochemical Content, Antioxidant and Antimicrobial Effects of *Thapsia garganica* L. Leaves and Roots Grown Wild in North-west Algeria

Aici Djahida^{1,3}, Benmehdi Houcine^{1,2}

10.18805/IJArE.A-648

ABSTRACT

Background: Oxygen-centre free radicals and other reactive oxygen species (ROS) are continuously produced *in vivo*, resulting in cell death and tissues damage. Besides, the increasing resistance to existing antimicrobial agents has become a major problem. The present study aims to evaluate the antioxidant and antimicrobial activities of the *Thapsia garganica* L. leaves and roots.

Methods: Broth dilution and single spore methods were developed and seven microorganisms were used. The evaluation was performed by measuring the diameter of the growth inhibition zones around the holes *via* the determination of the inhibition percentage of mycelium growth.

Result: The determination of the polyphenol contents, total flavonoids and condensed tannins of the aqueous extract for both leaves and roots gave respectively (2.21 mg, 2.63 mg/ 100 mg gallic acide equivalents), (2.39 mg, 0.49 mg/100 mg catechin equivalent), (0.12 mg, 0.04 mg/100 mg catechin equivalent) in dry matter. The results of antioxidant activity showed that the methanolic, flavonoids and tannins extracts showed a potent scavenging activity with $IC_{50} = 0.41; 0.81; 1.39; 1.80$ and 1.90 mg/ml, respectively. As regards for antimicrobial activity, an important inhibition of the proposed extracts has been observed against the tested strains.

Key words: Antimicrobial activity, Antioxidant activity, Essential oils, Polyphenols content, Selective extracts, *Thapsia garganica* L.

INTRODUCTION

For a long time, plants have been subject to extensive research, heightened by the hope of obtaining therapeutically active molecules. More specifically, the therapeutic use of plants is very old and is experiencing a revival (Kabouche *et al.*, 2005). Plants produce a vast array of specialized metabolites, many of which are used as pharmaceuticals, flavors, fragrances and other high-value fine chemicals (Oksman-Caldentey *et al.*, 2004).

Polyphenols are a large family of natural compounds widely distributed in the plant kingdom, which have seen growing interest and recognition for their beneficial health effects (Lrhofri *et al.*, 2016). Generally, each of these categories contains thousands of known compounds with many more awaiting discovery (Xiao *et al.*, 2013). Among the tens of thousands of plant-specialized metabolites, many display potent biological activities and have been used extensively as pharmaceuticals (Rates *et al.*, 2001). A significant number of studies has focused on the biological activities of phenolic compounds known as antioxidants and free radical scavengers (Saritha *et al.*, 2014). Antioxidants are a large group of compound which is formed of enzymes, vitamins, some metals and they may prevent oxidative damage in the cell due to free radicals (Senel *et al.*, 2018). Oxidative stress arises from malfunctioning internal antioxidant processes leading to range of pathophysiological conditions, primarily neurodegenerative disorders, biological aging and cancer (Kiran *et al.*, 2021).

Recently, the resistance of microorganisms to antibiotics is considered as major problem for public health. Hence, the

¹Laboratory LASNABIO, Department of Chemistry, University of Abou Bekr Belkaid, Tlemcen-13000, Algeria.

²Laboratory of Chemistry and Environmental Sciences, Department of Biology, University Tahri Mohamed, Bechar-08000, Algeria.

³Department of Exact Sciences, Normal Higher School, Bechar-08000, Algeria.

Corresponding Author: Benmehdi Houcine, Laboratory of Chemistry and Environmental Sciences, Department of Biology, University Tahri Mohamed, Bechar-08000, Algeria.
Email: h_ben90@yahoo.fr

How to cite this article: Aici, D. and Benmehdi, H. (2021). Phytochemical Content, Antioxidant and Antimicrobial Effects of *Thapsia garganica* L. Leaves and Roots Grown Wild in North-west Algeria. Indian Journal of Agricultural Research. 55(5): 519-526. DOI: 10.18805/IJArE.A-648.

Submitted: 03-05-2021 **Accepted:** 06-08-2021 **Online:** 06-09-2021

isolation and development of new antibacterial agents from medicinal plants has gained special interest for researchers. Antimicrobial resistance threatens the prevention and treatment of an ever-increasing range of infections caused by bacteria, parasites, viruses and fungi (Farjana *et al.*, 2014).

The *Thapsia* genus, belonging to the Apiaceae family is widely used in traditional medicine as an anti-inflammatory treatment to cure many diseases such as eczema (Tlili *et al.*, 2015). Members of *Thapsia* family are found around the Mediterranean, extending from the Atlantic coasts of Portugal and Morocco to Crete and other Greek Islands (Pujadas-Salvà *et al.*, 2003). The resin from *Thapsia* spp. has been used in

traditional medicine and in European pharmacopoeias as a remedy (Weitzel *et al.*, 2014).

The genus *Thapsia* is constituted by ten species distributed in the Western Mediterranean area and extended to the Atlantic coast of the Iberian Peninsula and Morocco. Relatively, a large number of secondary metabolites have been isolated from the genus *Thapsia* such as sesquiterpenoids and phenylpropanoids (Rubal *et al.*, 2007).

For the best of our knowledge, no scientific investigations concerning the antioxidant and antimicrobial properties of the main families of secondary metabolites of *Thapsia garganica* have been conducted so far. In this context, the aim of the present work is: (i) to carry out a primary phytochemical screening of the main secondary metabolites classes and determined the polyphenols content contained in the leaves and roots extracts, (ii) to evaluate the potential of *Thapsia garganica* as a source of natural antioxidants, (iii) to examine the antimicrobial activity of various selective extracts.

MATERIALS AND METHODS

Experimental conditions

The study was carried out during the 2014 season in the Laboratory of Chemistry, University Tahri Mohammed, Bechar- Algeria.

Plant collection and authentication

Fresh leaves and roots of *T. garganica* were collected in November 2014 from Ain Lahdjer village- Saida Province, North West of Algeria. The plant was taxonomically identified and authenticated by the Laboratory of Botany at Tlemcen University- Algeria.

Processing of plant material

The leaves and roots were chopped into small pieces that were shade dried over a period of 3 weeks. The dried leaves and roots were milled into fine powder by means of a mixer (IKA WERKE MILL M20). The powder was stored in clean polythene bags in a cool, dry place until further use.

Preparation of crude methanolic extract

The leaves and roots of *T. garganica* (1 g) were powdered and extracted for 24 h with 20 mL of methanol at room temperature. After filtration through Whatman No 0.45 µm, the resulting solution was evaporated under vacuum at 60°C by Buchi Rotavapor R-200 to dryness. The residues were dried, weighed (8.1 g; 5.02 g) and stored at 4°C in storage vials for experimental use as in (Benhammou *et al.*, 2013).

Preparation of flavonoids extract

The sample of stem or root was directly extracted with methanol at room temperature (20 mL/24 hours). Then, the suspension was filtered and the solvent was evaporated under vacuum. The residue was dissolved in 10 mL of boiling water and then successively partitioned with 10 mL of diethyl ether, 10 ml of ethyl acetate and 10 mL of n-butanol, respectively. After separation and evaporation, the organic

phases were weighed (0.33g; 1.82g; 1.08g) and stored before use following the method in (Bekkara *et al.* 1998).

Preparation of tannins extract

The extraction of tannins from *T. garganica* L. was carried out according to the method described by Zhang *et al.* (2008). The powder (5 g) of each part (leaves, roots) was extracted with 50 mL acetone-water (35/15, v/v) and stirred continuously for 72 h at room temperature. Then, the mixture was filtrated and evaporated under vacuum at 40°C to remove acetone. The remaining solution was washed with 15 mL of dichloromethane to remove lipid soluble substances. After that, the solution was further extracted with ethyl acetate at a ratio of 15/15 (v/v). The water layer was separated and extracted twice more similarly. Then the resulting water layer was evaporated to dryness and tannins residues were weighed (0.45g; 0.61g) and dissolved in methanol.

Preparation of saponosides extract

The dry seeds (200 g) were pulverized in a grinder. Powdered seeds were submitted to saponosides extraction according to protocol described by Bruneton (Bruneton 1999). A mixture of powdered material (105 g), distilled water (280 ml) and ethanol 96% (120 ml) was refluxed for 8 h. After filtration of the marc, the filtrate was extracted three times with 50 ml of n-butanol. After evaporation of ethanol and water, the title extract was obtained by precipitation with diethyl ether (m=0.94 g, yield = 0.89%, mp = 210°C). Then, the residue was dissolved in ethanol and kept in brine.

Extraction of essential oil

Samples of leaves were dried in shade at room temperature. Leaves were subjected to a steam distillation for 6 hours in a montage developed with a pressure cooker to increase the quantity of extracted oil. The distillation system consists of a source heat, a distiller, a condenser and a collection tank. The oil was dried over anhydrous sodium sulphate. After filtration, the residue was weighed (18.1g) and stored at 4°C until analysis (Lim *et al.*, 2017).

Phytochemical screening

All the prepared plant leaves and roots extracts were subjected to preliminary phytochemical screening for the presence of tannins, flavanoids, alkaloids, anthocyanins, saponins, coumarines, quinones, anthraquinones, reducing compounds, starch, sterols, fixed oils, fats and terpenoids using standard experimental procedures of analysis (Kokate 1994; Harborne 1998). This qualitative chemical characterization of the extracted constituents has been performed by means of colourful specific reactions and the formation of precipitations using suitable chemical reagents.

Determination of total phenolic content

The amount of total phenols in plant extracts was determined by the Folin-Ciocalteu reagent method (Waterman *et al.* 1994; Singleton *et al.*, 1999). About 20 µl of plant extract were mixed with Ciocalteu reagent (100 µl, (1:10; v/v) and

300 µl of sodium carbonate, Na₂CO₃, 7.5% (w/v). The mixture was stirred and incubated in dark at room temperature for two hours. The total phenols were determined spectrophotometrically at 750 nm. All determination was performed in triplicate. The results were expressed in equivalent mg gallic acid/g dry plant material with reference to the calibration curve of gallic acid. The studied concentrations of gallic acid are: (0; 0.01; 0.02; 0.05; 0.08; 0.1; 0.13; 0.15; 0.17 mg/ml).

Determination of flavonoids content

The aluminum chloride colorimetric method was used to determine flavonoid content (Lamaison *et al.* 1991; Bahorun 1998). Plant extract (1 ml) in methanol was mixed with 4 ml of distilled water and 0.3 ml of sodium nitrate solution (5%). As a next step, 0.3 ml of a solution of AlCl₃ 10% was added. After 10 min of incubation at room temperature in the dark, absorbance was measured at 510 nm. The results were expressed in equivalent milligrams of catechin per g dry plant material. The studied concentrations of catechin are: (2.5; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40 mg/ml).

Determination of condensed tannins

The method described by Porter (1986) was followed for the determination of condensed tannins present in the extracts. Briefly, Butanol-HCl reagent (butanol-HCl 95:5 v/v) Ferric reagent (2% ferric ammonium sulfate in 2N HCl) were mixed. The mixture was stored in a boiling water pool protected against light. After 1 h of incubation, absorbance was measured by spectrophotometer UV-Vis at 550 nm. Results were expressed in mg catechin equivalents by g of dry *Thapsia garganica* powder (mg PE/g) (Porter 1986). The studied concentrations of catechin were: 0.06; 0.16; 0.18; 0.24 and 0.30 mg/ml.

DPPH scavenging activity

In order to evaluate the antioxidant potential through free radical scavenging by the test samples, the change in optical density of DPPH radicals is monitored. Using the method described by Manzocco (1998), the sample extract (0.2 mL) is diluted with methanol and 2 mL of DPPH solution (0.5 mM) was added. After 30 min, the absorbance was measured at 517 nm (Manzocco *et al.*, 1998). The percentage of the DPPH radical scavenging was calculated using the equation given below:

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$$

Where

A_c is the control reaction (containing all reagents except the test compound) and A_s is the absorbance of the test compound. The commercially known antioxidant, ascorbic acid was used for comparison as a positive control. The tests were performed in triplicate. The extract concentration providing 50% inhibition (IC₅₀) was calculated based on the graph of inhibition percentage plotted against extract concentration.

Iron reducing power

The reducing power of *Thapsia garganica* extract and ascorbic acid was determined according to the method of Oyaizu (Oyaizu *et al.*, 1986). Different concentrations of *Thapsia garganica* extract (1 ; 2 ; 3 ; 4 et 5 mg/ml) in 1 ml of distilled water were mixed with 2.5 mL phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6) and 2.5 mL of 1% potassium ferricyanide [K₃Fe(CN)₆] and underwent vortex. The mixture was made homogeneous and incubated at 50°C for 20 min; aliquots of trichloroacetic acid (2.5 ml, 10%) were added to the mixture, which was then centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The upper layer of the solution (2.5 ml) was mixed with distilled water (2.5 ml) and FeCl₃ (0.5 ml, 0.1%) and the absorbance was measured at 700 nm. Increased absorbance of the reaction mixture indicated better power reduction. Ascorbic acid was used as the standard. Phosphate buffer (pH 6.6) was used as blank solution. The absorbance of the final reaction mixture of three parallel experiments was taken and is expressed as mean ± standard deviation.

Antimicrobial assay

Microbial strains

The antibacterial and antifungal activities of different extracts were tested against a panel which included five bacteria, selected as representative species: *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Escherichia coli* (ATCC25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), obtained from the laboratory of Microbiology, Tahri Mohamed University, Bechar, Algeria. Two fungal strains: *Aspergillus flavus* and *Penicillium Purpurogenum* were isolated from coffee. The strains were grown on nutrient agar for the bacteria and on potato dextrose agar (PDA) for yeasts. For the antimicrobial tests, agar mueller hinton for bacteria and potato dextrose agar for fungal strains were used (Casiglia *et al.*, 2016).

Antibacterial activity test

The antimicrobial activity was evaluated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) that includes minimum bactericidal concentrations as previously described by Rigano (2011) (Rigano *et al.*, 2011) using the broth dilution method (Barry 1976). Extracts samples were tested in triplicate.

Antifungal activity test

The antifungal activity of different extracts of *T. garganica* was determined by the method of single spore. Antifungal potency was evaluated as the percentage inhibition of mycelium growth according to the formula by Philippe (2012):

$$\% I = \frac{C - E}{C} \times 100$$

Where

C and E are the mean growth or sporulation (mm) of controls and extracts, respectively. All tests were performed in triplicate (Philippe *et al.*, 2012).

Statistical analysis

The results were presented as the means \pm SEM. Correlation analysis of antioxidant activity versus the total phenolic content were carried out using the correlation and regression programmer in the EXCEL software.

Anti-oxidant activities measured by DPPH and FRAP assays were done in triplicates to test their reproducibility. All results are presented as mean \pm S.E. Correlations among data obtained were calculated using Pearson's correlation coefficient (r).

RESULTS AND DISCUSSION

Quinones, reducing compounds, saponosids, flavonoids and tannins were revealed to be present in *T. garganica*. However, basic alkaloids, Anthracenosides and Anthocyanosides were not detected in any of the tested fractions. Results demonstrated that leaves and roots of TG are either rich or of moderate content of alkaloids and flavonoids, which is the case in most of the families to which these plants belong. Leaves and roots of *T. garganica* revealed the presence of slight levels of anthracenosides and anthocyanosides.

The percentage yield of methanolic and saponosid extracts for both leaves and roots were dominated in comparison with other solvents extracted where, the lowest yielding was obtained for the etheric fraction of flavonoids extract and tannins extract. Hence, the leaves part gave 18% of essential oils.

The total phenolic content of the methanolic leaves and roots extracts is calculated from the calibration curve ($R^2 = 1$), were 2.211 ± 0.77 mg gallic acid / 100ml and 1.631 ± 0.56 mg gallic acid / 100 ml for the leaves and roots, respectively. The total flavonoid content of the methanolic leaves and roots extracts, calculated from the calibration curve ($R^2 = 1$), in terms of catechin equivalent ranged between 2.39 ± 0.83 mg/ml and 0.49 ± 0.17 mg/ml for leaves and roots, respectively. Condensed tannins content was determined by Butanol-HCl method using the calibration curve ($R^2 = 1$).

The amount of condensed tannins has been reported in milligram equivalents of catechin per milligram dry weight of the extract (mg CE/mg Dw).

The condensed tannins content of the extracts in terms of catechin equivalent were between 0.12 ± 0.04 mg/ml and 0.04 ± 0.01 mg/ml for leaves and roots, respectively.

The scavenging capacity of 1 mg doses of flavonoids, tannins, saponosids extracts and methanolic crude extract of *Thapsia garganica* leaves found to be 0.81, 1.39, 7.24 and 0.41 mg, respectively (Fig 1). On the other side, 1 mg doses of TG roots were founds to be 1.80, 5.79 and 1.90 mg for tannins, saponosids extracts and methanolic crude extract, respectively and these values were greater than that of 1 mg dose of ascorbic acid.

As shown in Fig 2, the reducing power of all secondary metabolites in leaves is stronger than that in roots extract, except for the saponosides extract in roots which exhibited a good reducing effect.

The graph below (Fig 2) shows that the crude methanolic extract and the tannins extract of the leaves have an interesting iron reducing power with concentrations 5, 4, 3, 2 and 1 mg/ml noticed with the decrease in absorbance of (1.8 to 0.4) and (2.5 to 0.8) respectively.

Previously, different studies mentioned that the antioxidant activity of plant extracts is positively correlated with bioactives compounds (Beniwal and Jood 2014).

The synthesis of antibacterial activity results revealed variation in bacteria inhibition zone of plant extracts. *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus cereus* was found to be the most inhibited bacteria by the saponosids and butanolic leaves extracts with inhibition halos of 20 mm and 13 mm for ethyl acetate leaves extracts. The methanolic extract of leaves and roots was also active against *Enterococcus faecalis* (09 mm). The flavonoids fractions exerted also potential effects of antibacterial activity against *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* with an inhibition diameter from 10 to 13 mm. However, *E. coli* shows a large

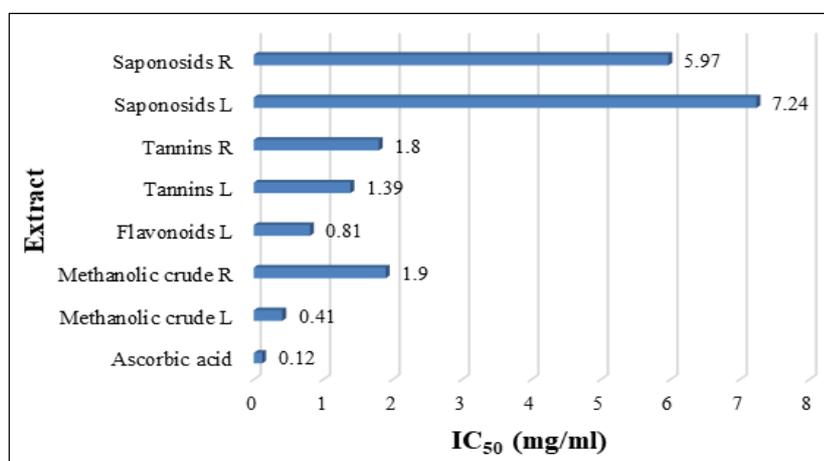


Fig 1: IC₅₀ (mg/ml) values of different extracts for free radical scavenging activity by DPPH radical (A lower IC₅₀ value indicates higher antioxidant activity; ascorbic acid was used as positive control; L: Leaves; R: Roots).

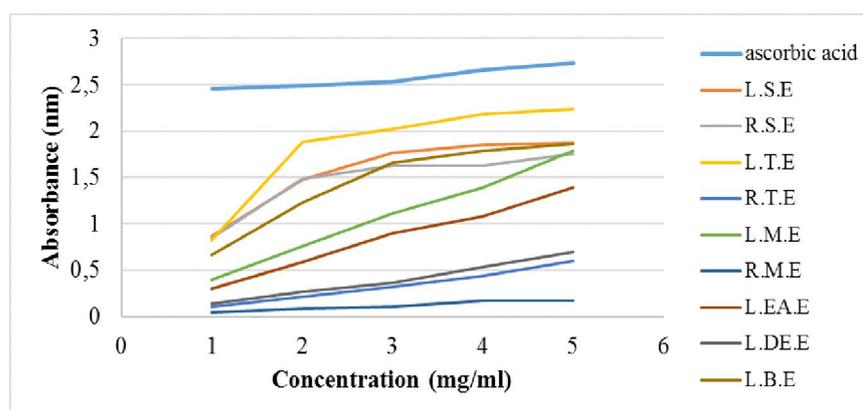


Fig 2: Ferrous reducing capacity of different extracts of the leaves and root of *Thapsia garganica*. Ascorbic acid was included as a positive control. Each value is the mean \pm standard deviation (L: Leaves, R: Roots, E: Extract, S: Saponosids, T: Tannins, M: Methanolic, EA: Ethyl acetate; DE: Diethyl ether, B: Butanolic).

resistance against all extracts for the four concentrations tested.

Antifungal activity of *Thapsia garganica* extracts was assayed by means of agar full diffusion method. The result revealed that the different extracts of *Thapsia garganica* showed significant reduction in the growth of *Aspargillus flavus* and *Penicilline purpurogenum*.

The noncytotoxic concentrations of plant extracts (0.5; 0.25; 0.125; 0.0625 mg/mL) were used for antifungal activity tests. All results are illustrated in Fig 3.

Phytochemical analysis is very useful in the evaluation of the active biological components of some vegetables and medicinal plants. We noticed that the phytochemical screening findings in this work are in harmony with those reported by Alghazeer (2012) where *Thapsia garganica* L. showed to be rich in alkaloids, flavonoids, tannins, terpenoids, coumarin, saponosids and anthraquinones (Alghazeer *et al.*, 2012). Some of these active components have been demonstrated to possess a wide variety of biological activities such as antimicrobial, antioxidant, antitumor and antiophidic.

Methanolic, saponosides, flavonoids and tannins extracts were obtained in different yields. For instance, that of essential oils leaves yielded (18.1%) and this result correlates with Tlili, N. and al who mentioned that seeds of *Thapsia garganica* contain 30.46% of oil. Solvent polarity plays a key role in increasing phenolic solubility (Naczka *et al.* 2006). The results show that using methanol as an extraction solvent works is the best method for the extraction of various active phytochemicals, especially polar antioxidants (Allothman *et al.*, 2009). Accordingly, Michiels had suggested that selection of the most efficient solvent for phenolic compounds extraction must depend on the used food matrices (Michiels *et al.*, 2012).

As for the comparison of total phenolic content Andreotti mentioned that the average amounts of total phenolics were about 25 mg / g dry matter within 60 days after full bloom and decreased to 3 mg / g dry matter when maturing in the pulpy tissue (Andreotti *et al.*, 2008). While *T. garganica*

collected from different regions of Libya between spring and early summer of 2009 had the lowest value (28.53 ± 3.82 mg GAE/g DW) (Alghazeer *et al.*, 2012). Tlili *et al.* (2015) found that the total polyphenol contents of seed oil obtained from *T. garganica* are 24.65 mg GAE / g DR. It is well known that phenolic compounds play a crucial role on the free radical scavenging and reduction of oxygen concentration, or protection and regeneration of other antioxidant molecules (Zhang *et al.*, 2010). While the total flavonoid contents seed oil obtained from *T. garganica* varied from $4.98 \text{ mg QE g}^{-1}$ DR. As mentioned in literature, the condensed tannins values of seed oil obtained from *T. garganica* varied between 0.64 mg and CE g^{-1} DR (Tlili *et al.*, 2015). The production of tannins seems to depend to a considerable extent on extrinsic factors, most notably soil conditions and light intensity. The impact of light can be quite extraordinary at the intraplant level so that the foliage in different parts of a shrub or tree can vary by several percentage points in its tannin content (Waterman *et al.*, 1994). The underlying mechanisms by which extrinsic factors, notably light, influence tannin levels has been speculated upon but remains in need of hard experimental data collection performed under conditions where as many of the potential variables as possible are controlled (Iqbal *et al.*, 2011).

The scavenging capacity of 1 mg doses of flavonoids, tannins, saponosids extracts and methanolic crude extract of *Thapsia garganica* leaves were found to be 0.81, 1.39, 7.24 and 0.41 mg, respectively. On the other hand, 1 mg doses of *Thapsia garganica* roots were found to be 1.80, 5.79 and 1.90 mg for tannins, saponosids extracts and methanolic crude extract, respectively and these values were greater than that of 1 mg dose of ascorbic acid.

The results obtained for the free radical scavenging activity suggest that all the extracts of *Thapsia garganica* possessed the ability to quench free radical from reaching biomolecules (polyunsaturated fatty acids, sugars and amino acids *etc.*) in susceptible biological and food systems (Halliwell *et al.*, 1995).

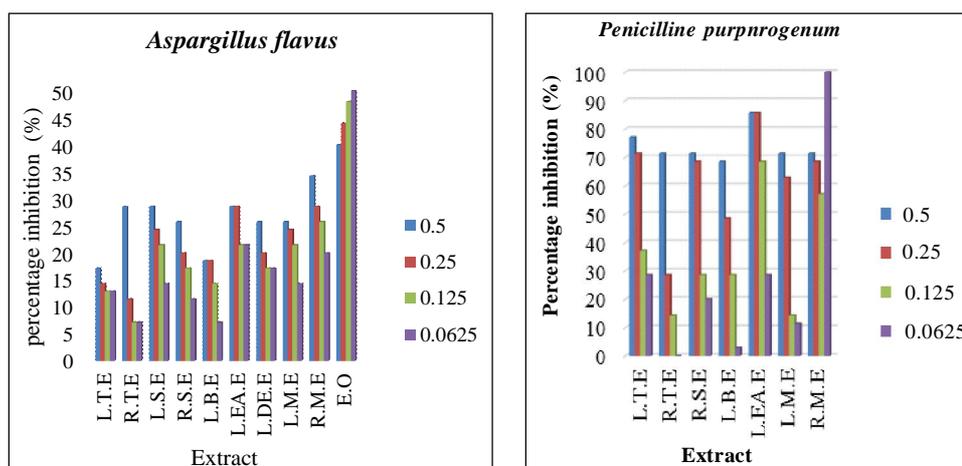


Fig 3: Antifungal activity of different extracts of *T. garganica* (leaves and roots).

L.T.E: Leaf tannins extract; R.T.E: Root tannins extract; L.S.E: Leaf saponosides extract; R.S.E: Root saponosides extract; L.B.E: Leaf buthanolic extract; L.EA.E: Leaf ethyl acetate extract; L.DE.E: Leaf diethyl ether extract; L.M.E: Leaf methanolic extract; R.M.E: Root methanolic extract.

Fe (III) reduction is often used as an indicator of electron-donating activity. As described above, the crude methanolic extract and the tannins extract of the leaves have an interesting iron reducing power which has been confirmed by the work of Wannas (2010) and concerning methanolic fractions (Wannas *et al.* 2010) also adopted by the results of Kanoun (2011) concerning the butanol and ethyl acetate fractions of flavonoids (Kanoun 2011).

These results prove that the crude extract in leaves is rich in reductones such as phenolic compounds that produce the total antioxidant activity. Therefore, the reducing power is a very important aspect for the estimation of the antioxidant activity (Ksouri *et al.*, 2008).

In vitro preliminary screening of the antibacterial activity of different extracts of leaves and roots was studied against five microorganisms using the filter paper disc agar diffusion technique. The disc diffusion assay was only used as an indication of anti-microbial activity since the amount of extract or fractions that adhered to the disc was not quantitatively determined. The analysis of the antibacterial potency showed that among the studied bacteria, the most sensitive to be applied are saponosides and butanolic leaves extracts: *Pseudomonas aeruginosa* (\varnothing 20 mm) and *Bacillus cereus* (\varnothing 13 mm). The methanolic extract of leaves and roots was also active against *Enterococcus faecalis* (\varnothing 09 mm). The flavonoids fractions exerted also potential effects of antibacterial activity against *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* with inhibition halos from 10 to 13 mm. However, *E. coli* shows a large resistance against all extracts for the four concentrations tested. Our results are in good agreement with the findings of Alghazeer *et al.* (2012) who found an antibacterial effect of the leaves of *Thapsia garganica* against *Staphylococcus aureus*, *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa* with diameters of inhibition zones equal to 16, 16 and 10 mm, respectively (Alghazeer *et al.*, 2012).

For the antifungal activity, it was found that the fungi inhibition zone ranged from 0 to 46 mm. The highest values were recorded with the roots methanolic extract against *Penicilline purpurogenum*. As shown in Fig 3 above, the saponosides and flavonoids extracts of both leaves and roots showed a significant antifungal activity with a percentage inhibition of 28 to 80%. Essential oils also indicated a strong antifungal activity against *Aspergillus flavus* (p.i 50%). In contrast, leaves tannins and butanolic extracts did not show any antifungal effect against *Aspergillus flavus*.

CONCLUSION

In this study, the quantitative determination of phenolic compounds, the antioxidant and the antimicrobial properties of *Thapsia garganica* (leaves and roots) were evaluated. Phytochemical analysis showed that the major chemical constituents of the extract were flavonoids, tannins, volatile oils and saponosides. The results obtained may suggest that methanolic extract possesses compounds with antioxidant properties which can be used as natural preservative. These activities were correlated with high level of total phenolic content, flavonoids and condensed tannins. Likewise, these compounds may have potential use as antioxidative preservatives in emulsion-type systems because they are able to scavenge free radicals. However high level antibacterial activity was shown by saponosides extract against *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus cereus*. Also, a moderate antibacterial activity was shown by flavonoids fractions against *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. On the other hand, *E. coli* was found to be the most resistant pathogen against most of the extracts tested. Furthermore, the majority of extracts showed a good antifungal activity against the tested microorganisms. It is interesting to note that *in-vivo* studies are needed to further confirm the advantageous quality of these extracts.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are thankful to Tahri Mohamed Bechar laboratories for supporting this research.

Authors' contributions

All the authors have contributed equally to this research work.

Conflicts of interest

There were no conflicts of interest or financial support among the authors.

Authors' funding

This research received no external funding.

REFERENCES

- Alghazeer, R., El-Saltani, H., Saleh, N., Al-Najjar, A., Hebail, F. (2012). Antioxidant and antimicrobial properties of five medicinal Libyan plants extracts. *Natural Sciences*. 4: 324.
- Allothman, M., Bhat, R., Karim, A.A. (2009). Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chemistry*. 115: 785-88.
- Andreotti, C., Ravaglia, D., Ragaini, A., Costa, G. (2008). Phenolic compounds in peach (*Prunus persica*) cultivars at harvest and during fruit maturation. *Annals of Applied Biology*. 153: 11-23.
- Bahorun, T. (1998). Substances naturelles actives: la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. In: Second Annual Meeting of Agricultural Scientists. 83.
- Barry, A.L. (1976). Methods for Testing Antimicrobial Combinations. *The Antimicrobial Susceptibility Test: Principles and Practices*. Lea and Febiger, Philadelphia, 105.
- Bekkara, F., Jay, M., Viricel, M.R., Rome, S. (1998). Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of two *Vicia faba* cvs differing in their seed tannin content and study of their seed and root phenolic exudations. *Plant and Soil*. 203: 27-36.
- Benhammou, N., Ghambaza, N., Benabdelkader, S., Atik-Bekkara, F., Panovska, F.K. (2013). Phytochemicals and antioxidant properties of extracts from the root and stems of *Anabasis articulata*. *International Food Research Journal*. 20: 2057.
- Beniwal, P. and Jood, S. (2014). Total phenolic content and antioxidant activity of by-products from cereal and legume milling industries. *Asian Journal of Dairy and Food Research*. 33: 307-310.
- Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*. 3rd ed. France: Paris: Lavoisier Publisher.
- Casiglia, S., Riccobono, L., Bruno, M., Rosselli, S., Senatore, F., Senatore, F. (2016). Chemical composition of the essential oil from *Thapsia garganica* L. (Apiaceae) grown wild in Sicily and its antimicrobial activity. *Natural Product Research*. 30: 1042-52.
- Farjana, A., Zerín, N., Kabir, M.S. (2014). Antimicrobial activity of medicinal plant leaf extracts against pathogenic bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 4: S920-23.
- Halliwell, B., Aeschbach, R., Löliker, J., Aruoma, O.I. (1995). The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*. 33: 601-17.
- Harborne, J.B. (1998). Phenolic compounds. *Phytochem Methods*. 37-99.
- Iqbal, Z., Sajid, M.S., Abbas, R.Z., Sindhu, Z.U.D. (2011). Determination of condensed tannin contents from different plants of Kherimurat Rangeland (Attock, Pakistan). *Journal of Agriculture and Social Research*. 7: 114-16.
- Kabouche, A., Kabouche, Z., Seguin, E., Tillequin, F., Bruneau, C. (2005). A phenylethanoid glycoside and flavonoids from *Phlomis crinita* (Cav.) (Lamiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. 8: 813-16.
- Kanoun, K. (2011). Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis* L. (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine). Magister dissertation. Abou Bekr Belkaid Tlemcen University-Algeria.
- Kiran, S., Johnson, J.B., Mani, J.S., Portman, A., Mizzi, T. and Naiker, M. (2021). Commercial lentils (*Lens culinaris*) provide antioxidative and broad-spectrum anti-cancerous effects. *Legume Research*. 44(2): 202-206.
- Kokate, C.K. (1994). *Practical Pharmacognosy*. 4th ed. New Delhi: Vallabh Prakan.
- Ksouri, R., Megdiche, W., Falleh, H., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Smaoui, A., et al. (2008). Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *Comptes Rendus-Biologies*. 331: 865-73.
- Lamaison, J.L., Carnat, A. (1991). Teneurs en principaux falvonoïdes des fleurs et des feuilles de *Crataegus monogyna* Jacq. et de *Crataegus laevigata* (Poiret) DC. en fonction de la période de végétation. *Plantes médicinales et phytothérapie*. 25: 12-16.
- Lim, S.F., Pah, P.Y.L., Chua, S.N., Kuan, H.T. (2017). Optimisation of water soluble essential oil from lemongrass leaves using steam distillation. *Pertanika Journal of Science and Technology*. 25:137-43.
- Lrhorfi, L.A., Dahmani, F.Z., Elyahyoui, O., Berrani, A., Samama, A., Kerroui, S., et al. (2016). The secondary metabolites composition of extracts *Genista Quadriflora* of Morocco. *European Scientific Journal*. 12: 79-88.
- Manzocco, L., Anese, M., Nicoli, M.C. (1998). Antioxidant properties of tea extracts as affected by processing. *LWT-Food Science and Technology*. 31: 694-98.
- Michiels, J.A., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Dommes, J. (2012). Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. *Food Chemistry*. 130: 986-93.
- Naczek, M., Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41: 1523-42.
- Oksman-Caldentey, K.M., Inzé, D. (2004). Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in Plant Science*. 9: 433-40.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*. 44: 307-15.
- Philippe, S., Souaïbou, F., Guy, A., Sébastien, D.T., Boniface, Y., Paulin, A., et al. (2012). Chemical composition and antifungal activity of essential oil of fresh leaves of *Ocimum gratissimum* from benin against six mycotoxigenic fungi isolated from traditional cheese wagashi. *Research Journal of Biological Sciences*. 1: 22-27.

- Porter, L.J. (1986). Number-and weight-average molecular weights for some proanthocyanidin polymers (condensed tannins). *Australian Journal of Chemistry*. 39(4): 557-62.
- Pujadas-Salvà, A.J., Plaza-Arregui, L. (2003). Studies on *Thapsia* (Apiaceae) from north-western Africa: A forgotten and a new species. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 143: 433-42.
- Rates, S.M.K. (2001). Plants as source of drugs. *Toxicon*. 39: 603-13.
- Rigano, D., Arnold, N.A., Conforti, F., Menichini, F., Formisano, C., Piozzi, F., *et al.* (2011). Characterisation of the essential oil of *Nepeta glomerata* Montbret *et Aucher ex Benth* from Lebanon and its biological activities. *Natural Product Research*. 25: 614-26.
- Rubal, J.J., Moreno-Dorado, F.J., Guerra, F.M., Jorge, Z.D., Saouf, A., Akssira, M. *et al.* (2007). A pyran-2-one and four meroterpenoids from *Thapsia transtaganana* and their implication in the biosynthesis of transtaganolides. *Phytochemistry*. 68: 2480-86.
- Saritha, B., Karpagam, S. (2014). Studies on antioxidant activity, phenol and flavonoid content of *Pisonia alba* span. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 7: 106-09.
- Senel, S. N., Erdem, T. L., Ozcan, I., Uslu, E. and Oguz, N. (2018). Increase of free radical levels in the periodontal tissues of therapeutic dose radiation applied rats and potential protective effects of bioflavonoids and polyphenols (ENOANT®). *Indian Journal of Animal Research*. 52(12): 1774-1777.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 299: 152-78.
- Tlili, N., Mejri, H., Lajnef, H.B, Feriani, A., Khaldi, A., Nasri, N. (2015). Unexploited *Thapsia garganica*, *Orlaya maritima* and *Retama raetam* seeds: potential sources of unsaturated fatty acid and natural antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 92: 1175-81.
- Wannes, W.A., Mhamdi, B., Sriti, J., Jemia, M.B., Ouchikh, O., Hamdaoui, G., *et al.* (2010). Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food and Chemical Toxicology*. 48: 1362-70.
- Waterman, P.G., Mole, S. (1994). *Analysis of phenolic plant metabolites*: Blackwell Scientific Publications.
- Weitzel, C., Rønsted, N., Spalik, K. and Simonsen, H.T. (2014). Resurrecting deadly carrots: Towards a revision of *Thapsia* (Apiaceae) based on phylogenetic analysis of nrITS sequences and chemical profiles. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 174(4): 620-636.
- Xiao, M., Zhang, Y., Chen, X., Lee, E.J., Barber, C.J., Chakrabarty, R., *et al.* (2013). Transcriptome analysis based on next-generation sequencing of non-model plants producing specialized metabolites of biotechnological interest. *Journal of Biotechnology*. 166: 122-34.
- Zhang, L., Chen, J., Wang, Y., Wu, D., Xu, M. (2010). Phenolic extracts from *Acacia mangium* bark and their antioxidant activities. *Molecules*. 15: 3567-77.
- Zhang, S.Y., Zheng, C.G., Yan, X.Y., Tian, W.X. (2008). Low concentration of condensed tannins from catechu significantly inhibits fatty acid synthase and growth of MCF-7 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 371: 654-58.