

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Kasdi Merbah Ouargla  
Faculté des sciences de la nature et de la vie  
Département des Sciences Biologiques



## Thèse

*Présentée en vue de l'obtention du diplôme de*

**Doctorat en Biologie**

*Option : Biochimie appliquée*

## Thème

**Contribution à l'étude des fractions polaire et  
apolaire de *Thapsia garganica* L**

Présenté par :

**Mme NEBEG Halima**

Devant le Jury composé de :

M.	OULD EL HADJ Mohamed DIDI	Professeur (Université Kasdi Merbah, OUARGLA)	Président
Mme.	BOUDJENAH Saliha	Professeur (Université Kasdi Merbah, OUARGLA)	Examinatrice
M.	SAIDI Mokhtar	Professeur (Université Kasdi Merbah, OUARGLA)	Examineur
M.	OUINTEN Mohamed	Professeur (Université Amar Téliidji, LAGHOUAT)	Examineur
M.	YOUSFI Mohamed	Professeur (Université Amar Téliidji, LAGHOUAT)	Directeur de thèse
Mme.	BENAROUS Khadidja	MCA (Université Amar Téliidji, LAGHOUAT)	Co-Directrice de thèse



Année universitaire 2019-2020

*Je dédie cette thèse À:*

*Mes très chers parents*

*Mon cher époux Khaled*

*Mes chères sœurs et mes frères*

*Mon adorable ange Mohamed*

*Mes nièces et mes neveux*

*À tous ceux qui m'aiment*

## Remerciements

*Je remercie avant tout ALLAH tout puissant de m'avoir guidé toutes les années d'étude, et de m'avoir donné la volonté, la patience et le courage.*

*Au terme de cette expérience qui représente la réalisation d'une thèse de doctorat, je tiens à remercier les personnes qui ont rendu possible l'élaboration de ce travail.*

*Je tiens à remercier sincèrement mon directeur de Thèse, Monsieur Pr. YOUSFI Mohamed, Directeur du laboratoire des sciences fondamentales, Université de Laghouat, pour l'aide qu'il m'a apporté ainsi que pour sa disponibilité tout au long de ma thèse. J'espère être digne de la confiance que vous avez placée en moi en me guidant dans l'élaboration et la mise au point de ce travail. Veuillez trouver dans ce travail, l'expression de mes sentiments les plus respectueux.*

*Mes profonds remerciements s'adressent à ma Co-directrice de Thèse, Dr BENAROUS Khadidja qui a régulièrement suivi mon travail et m'a fourni de nombreux conseils. Je suis infiniment reconnaissante pour votre aide.*

*Mes remerciements vont également à Monsieur le Pr. Mohamed Didi OULD EL HADJ d'avoir accepté de présider le jury de ma soutenance de thèse.*

*Je tiens aussi à remercier les examinateurs Monsieur le Pr. SAIDI Mokhtar, Monsieur le Pr. OUINTEN Mohamed et Madame la Pr. BOUDJENAH Salha d'avoir accepté de juger ce travail et m'avoir fait l'honneur de leurs présences*

*Mes sincères gratitude vont aussi à mes enseignants: Pr. Mohamed OUINTEN, M. Hamid GUENANE et M. Youcef BOUBRIMA, M<sup>me</sup> Farida ALLAL, M<sup>me</sup> Zohra BENDAOUD, et à tous mes enseignants auxquels je suis reconnaissante.*

*Je tiens à remercier spécialement mes chères amies ELHOUITI Fatiha, Djalila TAKHI, Zohra ZOUKHREF, Nadia CHALLA, Saida Maache qui ont toujours été là pour moi. Leur soutien inconditionnel et leurs encouragements ont été d'une grande aide*

*Mon remerciements vont aussi à mes amis(es) et collègues Ibrahim SIFI, Fatiha BENTAHAR, Aicha Hamdi, Hadjer AOUISSI, Safia GACEMI, Lamia KRAZA, Salim ZEROUK, Ismahane TALEB, Ibtisem SOUFFI, Malika MAAMRI,*

## Remerciements

*Je remercie chaleureusement l'ensemble des personnes du Laboratoire des sciences fondamentales de l'université de Laghouat particulièrement M. Mohamed HARATH, M. Nadhir GOURINE, M. Omar DEJRIDANE et M<sup>me</sup> Chahrazade HAMIA*

*J'exprime mes plus vifs remerciements au responsable des laboratoires du Département de Biologie : M. Mustapha HADJOUDDJA, et aux ingénieurs de laboratoires .*

*Mes parents, mes frères : Ahmed , Djamel, Mohamed et Hamza, mes sœurs: Djamila et Hadda vos valeurs, votre soutien, la joie d'être ensemble. Merci pour tout !*

*Un merci très spécial, à mon époux Khaled pour sa patience et surtout pour son appui inconditionnel. Merci d'être à mes côtés dans les moments les plus difficiles de ma vie....*

*Un grand merci à toutes les personnes qui m'ont soutenu de près ou de loin au cours de la réalisation de ce modeste travail.*

## Résumé

L'analyse par CG/SM des esters méthyliques d'acides gras (EMAG) des différentes huiles de graines, feuilles et racines de *Thapsia garganica* montre qu'ils n'ont pas le même profil en acide. Ces huiles ont des propriétés différentes, et les huiles de racines et feuilles sont plus riches en insaponifiables. Plusieurs extractions avec des solvants à polarités croissantes (DCM, Ac-O-Et, MeOH) sont effectuées sur les différentes parties de la plante. Les extraits obtenus n'ont pas les mêmes teneurs en composés phénoliques. L'étude de l'activité antioxydante de ces extraits par les deux tests DPPH et FRAP montre que les extraits méthanoliques des graines ont une activité très importante et que le classement des capacités antioxydantes de nos extraits selon la méthode DPPH est totalement différent du classement obtenu par la méthode de réduction du fer. L'étude de l'activité antioxydante des huiles et des insaponifiables de *Thapsia garganica* montre une très forte activité des extraits de racines et de feuilles par rapport aux graines. L'effet des extraits acétate d'éthyle de *Thapsia garganica* sur l'activité enzymatique de la lipase de *Candida rugosa* semble intéressant. Ces résultats nous ont incité à effectuer une modélisation par amarrage moléculaire afin de tester l'effet des principaux composés bioactifs synthétisés par cette plante sur la lipase de *Candida rugosa* et la lipase pancréatique humaine. Une différence importante dans les affinités de ces molécules vis-à-vis des deux enzymes est trouvée.

**Mots clés:** *Thapsia garganica*, lipide, insaponifiables, tocophérols, composés phénoliques, activité antioxydante, lipase, *Candida rugosa*, lipase pancréatique humaine, inhibition

## Abstract

Analysis by GC / MS of fatty acids methyl ester (FAME) of the seed, leaf and root oils of *Thapsia garganica* shows that they have different fatty acid profiles. These oils have different properties, and the oils from roots and leaves are richer in unsaponifiables. Extractions with solvents with increasing polarities (DCM, Ac-O-Et, MeOH) are carried out on the different plant parts. The obtained extracts do not have the same contents of phenolic compounds, and for the different studied parts, the methanolic extracts prove to be the most rich. The study of the antioxidant activity of these extracts by the two tests DPPH and FRAP shows that the methanolic extracts of the seeds have a very important activity and that the classification of the antioxidant capacities of our extracts according to the DPPH method is totally different from the classification obtained by the FRAP method. The study of the antioxidant activity of oils and unsaponifiables of *Thapsia garganica* shows a very strong activity of extracts of roots and leaves compared to seeds extracts. The effect of ethyl acetate extracts of *Thapsia garganica* on the enzymatic activity of *Candida rugosa* lipase appears to be interesting. These results prompted us to carry out molecular docking modeling to test the effect of the main bioactive compounds synthesized by this plant on *Candida rugosa* lipase and human pancreatic lipase. An important difference in the affinities of these molecules against both enzymes is found.

**Key words:** *Thapsia garganica*, lipid, unsaponifiables, tocopherols, phenolic compounds, antioxidant activity, lipase, *Candida rugosa*, human pancreatic lipase, inhibition

## ملخص:

أظهرت دراسة المادة الدهنية لبذور و أوراق و جذور نبتة بونافع أنها تتميز بخصائص مختلفة و ان زيوت الجذور والاوراق تحتوي على كمية معتبرة من التوكوفيرولات و المواد الغير قابلة للتصوين . قمنا ايضا بدراسة الفينولات التي تم إستخلاصها من مختلف اجزاء النبتة بمذيبات متعددة و تبين انه ليس لديها نفس المحتوى من المركبات الفينولية ، بالنسبة لمختلف الأجزاء التي تمت دراستها ، مستخلصات الميثانول اثبتت أنها الأكثر ثراءً. تبين من خلال دراسة النشاط المضاد للأكسدة لهذه المستخلصات بواسطة اختبارين DPPH و FRAP أن المستخلصات الميثانولية للبذور لها نشاط مهم للغاية وأن تصنيف مستخلصاتنا وفقًا لطريقة DPPH مختلف تمامًا عن التصنيف الذي تم الحصول عليه بواسطة طريقة FRAP. تظهر دراسة النشاط المضاد للأكسدة للزيوت و المواد الغير قابلة للتصوين نشاطًا قويًا جدًا لمستخلصات الجذور والأوراق مقارنة بمستخلصات البذور. النشاط التثبيطي لمستخلصات أسيتات الإيثيل ضد انزيم الليباز ، وتبين أن جميع أجزاء هذه النبتة لديها قدرة تثبيط مهمة. هذه النتائج دفعتنا إلى تنفيذ نمذجة لاختبار تأثير المركبات النشطة الرئيسية لهذه النبتة على الليباز الفطري و البشري. تم العثور على فرق مهم في ألفة هذه المثبطات اتجاه الانزيمين .

**الكلمات المفتاحية:** زيوت ، توكوفيرول ، مركبات فينولية ، نشاط مضاد للأكسدة ، إنزيم الليباز ، ليباز البنكرياس البشري ، تثبيط

## Table des matières

ABRÉVIATIONS .....	i
LISTE DES TABLEAUX .....	ii
LISTE DES FIGURES .....	iii
INTRODUCTION.....	2
<b>CHAPITRE I:Étude botanique de <i>Thapsia garganica</i></b>	
1. Présentation de la famille d'Apiacées.....	6
2. Présentation du genre : <i>Thapsia</i> .....	7
3. Présentation de l'espèce : <i>Thapsia garganica</i> L.....	8
3.1. Description Botanique.....	8
3.2. Utilisations de <i>Thapsia garganica</i> en médecine traditionnelle et moderne.....	10
3.3.Toxicité de <i>Thapsia garganica</i> .....	12
3.4. Travaux antérieurs.....	12
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	14
<b>CHAPITRE II : Étude de la fraction lipidique</b>	
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	17
1.Lipides.....	17
2. Classification .....	17
2.1. Lipides vrais .....	17
A) Lipides simples .....	17
B) Lipides complexes .....	18
2.2. Les composés à caractères lipidiques .....	21
3. Données générales sur les acides gras.....	21
3.1.Acides gras saturés.....	22
3.2.Acides gras insaturés.....	22
4. Données générales sur les tocophérols.....	22



5. Données générales sur les stérols.....	23
<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>25</b>
1. Préparation de la matière végétale.....	25
2. Extraction .....	28
3. Décoloration.....	29
4. Extraction des cires.....	29
5. Préparation des esters méthyliques des acides gras des différentes huiles de <i>Thapsia garganica</i> .....	30
5.1.Saponification.....	30
5.2.Estérification.....	30
5.3.Analyse des esters méthyliques par CG/SM.....	31
6. Extraction des insaponifiables.....	31
6.1. Protocole.....	32
7. Étude des tocophérols.....	32
7.1.Dosage spectrophotométrique des tocophérols totaux:.....	32
7.1.1.Principe:.....	32
<b>RÉSULTATS ET DISCUSSIONS.....</b>	<b>35</b>
1. Rendement d'extraction et propriétés des huiles obtenues.....	35
2. Analyse des esters méthyliques par CG/SM.....	38
3. Analyse des Tocophérols.....	43
4. Analyse des stérols.....	44
Conclusion:.....	45
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>46</b>
<b>CHAPITRE III : Activité antioxydante</b>	
<b>RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>50</b>
1. Métabolites secondaires.....	50
1.1.Généralités sur les métabolites secondaires.....	50
1.2.Les composés phénoliques.....	51

1.3. Terpénoïdes.....	53
1.4. Alcaloïdes.....	53
1.5. Stress oxydant.....	54
A.Antioxydants naturels .....	56
B.Antioxydants synthétiques .....	57
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>	<b>57</b>
1.Extraction des métabolites par un fractionnement solide -liquide.....	57
2. Dosages et quantification de quelques métabolites secondaires.....	58
2.1. Dosage des phénols totaux.....	58
2.2. Dosage des flavones et flavonols.....	59
a) Principe.....	59
b) Protocole.....	59
3. Étude de l'activité antioxydante des extraits.....	60
3.1.Test de DPPH.....	60
a. Principe.....	60
b. Protocole expérimental.....	60
3.2.Test de FRAP.....	61
a. Principe.....	61
b. Protocole expérimental.....	61
4. Analyse statistique.....	62
<b>RÉSULTATS ET DISCUSSIONS.....</b>	<b>62</b>
1. Rendement d'extraction.....	62
2. Dosages et quantification des phénols totaux et des flavonoïdes.....	64
3. L'activité antioxydante des différents extraits.....	71
3.1. Test DPPH.....	71
3. 2. Test FRAP.....	75

Conclusion.....	78
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	82
<b>CHAPITRE IV : Inhibition de la réaction enzymatique de la lipase de <i>Candida rugosa</i></b>	
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	84
1. Lipases.....	84
2. Mécanismes catalytiques.....	85
3. Intérêt de l'inhibition de la lipase.....	86
MATERIEL ET METHODES.....	87
1.Extraction des métabolites secondaires.....	88
3. Activité enzymatique de la lipase <i>Candida rugosa</i> :.....	88
3.Tests d'inhibition de l'activité de la lipase.....	89
4.Analyse statistique.....	90
5. Docking moléculaire.....	90
RÉSULTATS ET DISCUSSIONS.....	91
1.Inhibition de la réaction catalysée par la lipase.....	91
2.Docking des inhibiteurs sur la lipase de <i>Candida rugosa</i> :.....	95
Conclusion.....	105
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	105
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	111
ANNEXS.....	114

## Liste des Abréviations

**A** : Absorbance

**Ac-O-Et**: Acétate d'éthyle

**AG** : Acide Gras

**AGI** : Acide Gras Insaturés

**AGS** : Acide Gras Saturés

**CG/SM** : Chromatographie phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

**CLHP** : Chromatographie Liquide Haute Performance

**CPG** : Chromatographie Phase Gazeuse

**DCM**: chlorométhane

**DPPH** : 1,1-Diphényl-2-Picryl –Hydrazyl

**EMAG** : Esters Méthyliques d'Acides Gras

**F**: Feuilles

**G im**: graines immatures

**Gm**:graines matures

**I (%)** : Pouvoir d'Inhibition

**IC<sub>50</sub>** : Concentration inhibitrice

**M<sup>AG</sup>** : Masse moyenne des Acides Gras

**MeOH** : Méthanol

**M<sup>TAG</sup>** : Masse moléculaire des TriAcylGlycérols

**R**: Racines

## Liste des Tableaux

<b>Tableau 1</b> : Quelques caractéristiques de <i>Thapsia garganica</i> .....	9
<b>Tableau 2</b> : Quelques travaux réalisés sur <i>Thapsia garganica</i> .....	13
<b>Tableau 3</b> : Teneurs en Insaponifiables , cires ,s et les propriétés des huiles de <i>Thapsia garganica</i> .....	35
<b>Tableau 4</b> : Composition relative en acides gras des huiles de <i>Thapsia garganica</i> .....	39
<b>Tableau 5</b> : Composition relative en acides gras de l'huile de fruit <i>Thapsia garganica</i> .....	42
<b>Tableau 6</b> : Quantités des tocophérols dans les huiles de <i>Thapsia garganica</i> .....	43
<b>Tableau 7</b> : Quantité des stérols dans les huiles de <i>Thapsia garganica</i> .....	45
<b>Tableau 8</b> : Grandes classes de polyphénols chez les végétaux.....	52
<b>Tableau 9</b> :Teneurs en extraits bruts (m/m %) .....	63
<b>Tableau 10</b> : Teneurs en phénols totaux mg EAG/g (MS, Es ).....	66
<b>Tableau 11</b> : Teneurs en flavonoïdes mg EQ/g (MS, Es ).....	66
<b>Tableau 12</b> : Teneurs en polyphénols et flavonoïdes dans les différentes parties de <i>Thapsia garganica</i> mg EQ /g MS.....	71
<b>Tableau 13</b> : Les valeurs IC <sub>50</sub> de test DPPH pour les différents extraits de <i>Thapsia garganica</i> .....	72
<b>Tableau 14</b> : Valeurs IC <sub>50</sub> de test FRAP pour les différents extraits de <i>Thapsia garganica</i> exprimées en mg/ml.....	76
<b>Tableau 15</b> :Rendement d'extraction et les valeurs de IC <sub>50</sub> des extraits de <i>Thapsia garganica</i> .....	92
<b>Tableau 16</b> : Valeurs d'IC <sub>50</sub> de quelque extraits naturels selon les références.....	94
<b>Tableau 17</b> : Résultats générés par Autodock Vina après l'analyse.....	97

## Liste des Figures

<b>Figure 1</b> :Schéma d'un ombelle.....	6
<b>Figure 2</b> : Photographie illustrant les graines de quelques Apiacées (Paloma, 2012).....	7
<b>Figure 3</b> :Photographie illustrant le genre <i>Thapsia garganica</i> en pleine floraison (Photo prise le 14 avril 2017 à Tadjmout, Laghouat ).....	10
<b>Figure 4</b> : Photographie illustrant les feuilles ,les racines(photos prises le 15 mars 2017).....	10
<b>Figure 5</b> :La formule générale des glycérophospholipides.....	19
<b>Figure 6</b> : Structure des différentes glycérophospholipides.....	19
<b>Figure 7</b> :Structure des sphingolipides (Moussard, 2004).....	20
<b>Figure 8</b> :Structure des différents tocophérols et tocotriénols.....	23
<b>Figure 9</b> : Structure des phytostérols (Frénot, 2001).....	24
<b>Figure 10</b> :Photographie illustrant le champs de <i>Thapsia</i> .....	25
<b>Figure 11</b> :Photographie illustrant les feuilles, les graines et les racines de .....	26
<b>Figure 12</b> : Photographie illustrant les graines de <i>Thapsia garganica</i> avant et après l'enlèvement des ailes (photos prises le 20 juillet 2017).....	27
<b>Figure 13</b> : Photographie illustrant les racines de <i>Thapsia garganica</i> après nettoyage	27
<b>Figure 14</b> : Photographie illustrant les différentes parties de <i>Thapsia garganica</i> .....	28
<b>Figure 15</b> : Organigramme présentant la démarche expérimentale pour l'étude de la fraction lipidique de <i>Thapsia garganica</i> .....	34
<b>Figure 16</b> : La teneur en huiles des différentes parties de <i>Thapsia garganica</i> .....	35
<b>Figure 17</b> : Photographie illustrant les cires des feuilles ,racines et graines .....	38
<b>Figure 18</b> : L'acide pétrosélinique.....	41
<b>Figure 19</b> : Courbe d'étalonnage de la vitamine E.....	43
<b>Figure 20</b> : Courbe d'étalonnage du cholestérol.....	44
<b>Figure 21</b> : Procédure d'extraction par fractionnement solide-liquide.....	58
<b>Figure 22</b> : Réduction du radical libre DPPH.....	60

<b>Figure 23</b> : Teneurs en résidus secs obtenus par les différents solvants.....	64
<b>Figure 24</b> : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	65
<b>Figure 25</b> : Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	65
<b>Figure 26</b> : Histogramme représentant les teneurs en polyphénols dans les différents extraits.....	67
<b>Figure 27</b> : Histogramme représentant les pourcentages des flavonoïdes dans les différents extraits.....	68
<b>Figure 28</b> : Régression linéaire entre les taux de phénols et de flavonoïdes totaux...	68
<b>Figure 29</b> : Valeurs IC <sub>50</sub> de test DPPH des extraits polaires des différentes parties de 73	
<b>Figure 30</b> : Régression linéaire entre les valeurs IC <sub>50</sub> et les taux de phénols et de flavonoïdes .....	74
<b>Figure 31</b> : Valeurs IC <sub>50</sub> de test DPPH pour les extraits lipidiques de <i>Thapsia garganica</i> .....	75
<b>Figure 32</b> : Courbe de réduction de la Vitamine C.....	77
<b>Figure 33</b> : Valeurs IC <sub>50</sub> de test FRAP des différents extraits de <i>Thapsia garganica</i> 77	
<b>Figure 34</b> : La réaction d'hydrolyse d'un triglycéride par la lipase (Jaeger et al., 1994).....	84
<b>Figure 35</b> : Représentations de la structure de la lipase extraite de <i>Thermomyces lanuginosus</i> en conformations « fermé » et « ouverte ». Le « couvercle » est une hélice $\alpha$ mobile, indiqué en vert sur le schéma (Ollis et al., 1992).....	86
<b>Figure 36</b> : Schéma réactionnel de l'hydrolyse de p-NPL par la lipase microbienne (Benarous, 2010).....	89
<b>Figure 37</b> : Représentations graphiques I % = f (C) des différents extraits de <i>Thapsia garganica</i> .....	93
<b>Figure 38</b> : La meilleure solution obtenue d'amarrage de l'interaction moléculaire avec Tribolid .....	98
<b>Figure 39</b> : La meilleure solution obtenue d'amarrage de l'interaction moléculaire avec Thapsigargin.....	99
<b>Figure 40</b> : La meilleure solution obtenue d'amarrage de l'interaction moléculaire avec nortrilobolid .....	100
<b>Figure 41</b> : La meilleure solution obtenue d'amarrage de l'interaction moléculaire avec Thapsigargin.....	101

<b>Figure 42</b> : La meilleure solution obtenue d'amarrage de l'interaction moléculaire avec Thapsivillosin C.....	102
<b>Figure 43</b> : La meilleure solution obtenue d'amarrage de l'interaction moléculaire avec Tribolid Tribolid.....	103
<b>Figure 44</b> : La meilleure solution obtenue d'amarrage de l'interaction moléculaire avec Tribolid de nortribolid.....	104



# *Introduction*

## *Introduction*

---

Les plantes ont été depuis longtemps une source essentielle de médicaments. Une majorité de la population, et plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne uniquement encore avec des remèdes traditionnels à base de plantes ( Lavergne,1990).

L'industrie pharmaceutique elle-même s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites. Cette source en plantes médicinales semble inépuisable puisque seule une petite partie de 400000 espèces végétales ont été investiguée sur le plan phytochimique, et que chacune d'elles peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de constituants différents (Waridel, 2003).

Les médecines complémentaires et traditionnelles, dont fait partie la phytothérapie, ont été reconnues par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme très importantes, voire incontournables dans certains pays, dans les soins de santé primaires. L'OMS encourage donc vivement tous les pays membres à réaliser une politique d'intégration de ces médecines dans leurs systèmes de soins de santé primaire, et elle préconise de développer les connaissances sur ces différentes pratiques ainsi que la formation des acteurs de santé. Elle a établi des guides de bonnes pratiques afin de réaliser des études scientifiques sur ces médecines traditionnelles et complémentaires ( Lavergne,1990;Tiré de Comité OMS 1996)

Dans le but de la recherche de nouvelles molécules bioactives, il est préférable de ne pas baser le choix de plantes à étudier sur le seul hasard, mais de circonscrire ce choix selon divers critères et considérations, le plus utilisé est celui de leur utilisation en médecine populaire qui valorise l'expérience accumulée par les autochtones dans le monde entier.

La flore algérienne est caractérisée par sa diversité florale: méditerranéenne, saharienne et une flore paléo tropicale, estimée à plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques. Ces espèces sont pour la plupart spontanées avec un nombre non négligeable (15 %) d'espèces endémiques (Ozenda, 1977).

## Introduction

---

Dans le cadre de la connaissance et la valorisation des produits naturels d'origine végétale de notre pays. Nous procéderons à l'étude de l'espèce *Thapsia garganica* (famille d'Apiacées). Cette plante a fait l'objet de plusieurs études scientifiques montrant qu'elle est une source importante de composés bioactifs (Avato et al., 2001). Ainsi, on a mené dans des travaux antérieurs une étude préliminaire sur l'étude de la fraction lipidique de ses graines et les résultats obtenus sont motivants ce qui nous a encouragé de vérifier les raisons de l'usage de cette plante en médecine traditionnelle grâce à l'étude de quelques activités biologiques comme le pouvoir anti-radicalaire et l'activité enzymatique.

Le choix de cette plante est basé sur les critères suivants:

- ✓ Plante utilisée depuis longtemps dans la médecine traditionnelle, comme remède contre les rhumatismes et contre les douleurs de sciatique (Makunga et al., 2003);
- ✓ Très répandue en Algérie et notamment dans la région de Laghouat et non investiguée sur les plans phytochimique et pharmacologique ;
- ✓ Étudier pour la première fois la composition en lipides et l'activité antioxydante de différents extraits lipidiques et phénoliques des graines, feuilles et racines de cette plante.
- ✓ Aucune étude n'a été entreprise sur l'évaluation du pouvoir inhibiteur de Lipase par les extraits de *Thapsia garganica*.

L'objectif de notre étude est la valorisation phytochimique des graines, feuilles et racines de *Thapsia garganica*. Les principales parties de ce travail seront traitées selon le plan suivant :

Le premier chapitre de cette thèse sera consacré à la revue bibliographique des connaissances concernant l'espèce étudiée. Elle inclut la présentation botanique de la famille d'ombellifère et de l'espèce *Thapsia garganica*, ses principaux métabolites, ses usages traditionnels et activités biologiques,

## *Introduction*

---

Le deuxième chapitre sera destiné au travail expérimental. Il consiste en l'étude des huiles fixes des différentes parties de la plante.

Le troisième chapitre portera d'une part aux dosages des polyphénols totaux et flavonoïdes présents au niveau des différentes parties des plantes et d'autre part sur l'étude de l'activité antioxydante des différents extraits lipidiques et des extraits polaires .

La dernière partie est consacrée à l'étude de l'activité enzymatique des extraits acétate d'éthyle des différentes parties de *Thapsia garganica* en mesurant leurs pouvoirs inhibiteurs vis-à-vis de la lipase de *condida rigusa* , ensuite l'étude par la baie du Docking moléculaire ,et de la capacité de leurs principales molécules bioactives à inhiber les lipases de *condida rigusa* et pancréatique comme une des cibles pour le traitement de l'obésité .

Enfin, une conclusion générale qui résumera l'ensemble des résultats obtenus

## **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

AVATO, Pinarosa, FANIZZI, Francesco Paolo, et ROSITO, Isabella. The genus *Thapsia* as a source of petroselinic acid. *Lipids*, 2001, vol. 36, no 8, p. 845-850.

LAVERGNE, Roger. Le grand livre des tisaneurs et plantes médicinales de La Réunion. Copyright Gérard Doyen et Roger Lavergne, 1990.

MAKUNGA, N. P., JÄGER, A. K., et VAN STADEN, J. Micropropagation of *Thapsia garganica*—a medicinal plant. *Plant Cell Reports*, 2003, vol. 21, no 10, p. 967-973.

OMS. Lignes directrices concernant l'évaluation des médicaments à base de plantes. Tiré de Comité OMS d'experts des spécifications relatives aux préparations pharmaceutiques. Trente-quatrième rapport. Genève, 1996:188-194

OZENDA, P. Flore du Sahara: Editions CNRS. 1977.

WARIDEL, Patrice. Investigation phytochimique des plantes aquatiques *Potamogeton pectinatus* L., *P. lucens* L., *P. perfoliatus* L. et *P. crispus* L.(Potamogetonaceae). 2003. Thèse de doctorat. Université de Lausanne, Faculté des sciences.

Chapitre I

Étude botanique de *Thapsia garganica*

## 1. Présentation de la famille d'Apiacées

La famille d'Apiacées (Ombellifères) est l'une des familles des plantes les plus connues avec des caractères botaniques propres tels que:

- L'inflorescence en ombelle typique
- Formation des fruits secs spécialisés

L'inflorescence est de la forme d'ombelle simple dans laquelle les pédoncules floraux sont tous insérés au même point de la tige, et les fleurs sont toutes disposées sur une même surface sphérique, ou parfois plane (Figure1). C'est la raison pour laquelle on la nomme famille d'Ombellifères (Rasmussen et Avato, 1998).



**Figure 1:**Schéma d'un ombelle

Le nombre des sépales, pétales et étamines d'une fleur individuelle est de cinq pour chacune. Le pistil unique avec un ovaire infère composé de 2 carpelles, avec un ovule dans chacun. Après la fécondation, l'ovaire se développe en un fruit (Rasmussen et Avato, 1998).

Dans cette famille il y a environ 300 genres et plus de 3000 espèces largement distribués dans les régions tempérées où ils sont souvent utilisés comme des épices ou des médicaments en raison de la présence de métabolites secondaires tels que des coumarines, huiles essentielles et sesquiterpènes (Rasmussen et Avato, 1998; Glimn-Lacy et Kaufman, 2006).

Certaines plantes de cette famille sont en particulier utilisées lors de troubles digestifs comme les ballonnements et les douleurs intestinales ; il s'agit de l'aneth (*Anethum graveolens* L.), l'angélique (*Angelica archangelica* L.), l'anis (*Pimpinella anisum* L.), le carvi (*Carum carvi* L.), la coriandre (*Coriandrum sativum* L.). Toutes ces espèces (Figure 2) sont utilisées en Algérie et en plusieurs pays comme des épices (Paloma, 2012)



*Pimpinella anisum* L , Anis vert ( يانسون )



*Cuminum cyminum* L , Cumin ( كمون )



*Carum carvi* L, le carvi ( كراوية )



*Coriandrum sativum* L, la coriandre ( البقدونس )

**Figure 2:** Photographie illustrant les graines de quelques Apiacées (Paloma, 2012)

## 2. Présentation du genre : *Thapsia*

Ce genre était bien connu par les anciens qui lui ont donné son nom propre, estimant qu'il a été obtenu à l'origine de l'île de Thapsus (Morinet , 1809). Il s'agit d'un petit genre d'environ huit espèces distribuées dans la région Méditerranéenne. Son centre de diversité est situé dans la Méditerranée occidentale et se prolonge aux Côtes Atlantiques du Portugal et du Maroc ( Pujadas-Salvaà, et Plaza-Arregui, 2003).

*Thapsia* est très commun dans tout le pourtour méditerranéen, surtout abondant dans le Maghreb et, plus particulièrement, en Algérie où il est adapté à la sécheresse méditerranéenne et à l'aridité des steppes et des montagnes sahariennes; tous les sols lui conviennent, depuis les sables maritimes jusqu'aux sables sahariens.

Taxonomiquement, *Thapsia* est un genre complexe. Ainsi Tutin (1968) cite seulement trois espèces (*Thapsia garganica* L, *Thapsia maximum* Mill et *Thapsia villosa* L) (Pujadas-Salvaà, et Plaza-Arregui, 2003). Mais des études récentes ont ajouté, caractérisé et différencié d'autres espèces telles que le *Thapsia gymnesica* rosselló (1991, 1997), *Thapsia transtagana* Brot (1995), *Thapsia mineur* Hoffmanns et *Thapsia nitida* Lacaita (1996, 2000) (Pujadas-Salvaà, et Plaza-Arregui, 2003).

### 3. Présentation de l'espèce : *Thapsia garganica* L

#### 3.1. Description Botanique

Classification botanique (Selon la classification de Drude's 1898) (Rasmussen et Avato, 1998).

**Règne :** Plantae

**Famille :** Umbelliferae (Ombellifères)

**Sous famille :** Apiodeae

**Genre :** *Thapsia*

**Espèce :** *Thapsia garganica* L

**Noms habituels en Arabe :** Bou nâfaa , Drias ( Youssef M Ait , 2006).

*Thapsia garganica* L (Figures 3 et 4) est une plante toxique, son aire de répartition est méditerranéenne, en Algérie, au Maroc, en Tunisie, et en Libye. Il s'agit d'une plante herbacée vivace ( Youssef M Ait , 2006):

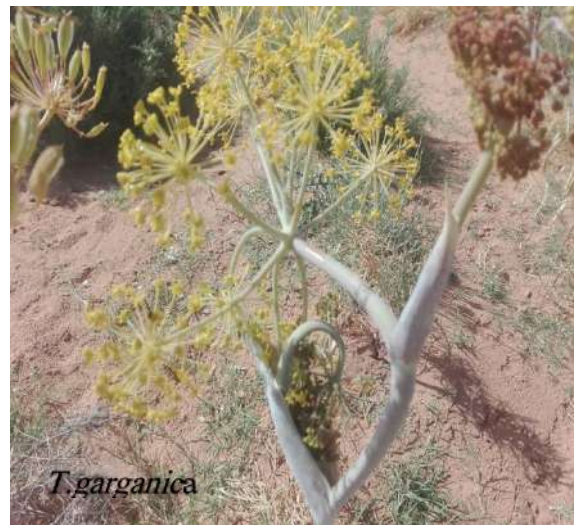


- Sa racine possède une écorce qui se présente sous forme de fragments, sa face externe est de couleur jaune brunâtre très claire, sa face interne est blanche, l'odeur de l'écorce de racine est presque nulle alors que sa saveur est à la fois piquante et caustique ;
- Sa tige est glabre et striée ;
- Les feuilles sont glabres ou à peine pubescentes en dessous, elles sont de couleur verte, leur forme diffère selon leur place ;
- L'inflorescence est en ombelle ;
- Le fruit est de forme elliptique, comprimé à sa face dorsale, possède des marges fortement ailées, ces ailes latérales, très développées, sont cordiformes à leurs extrémités, et sont finement striées ; elles ont une couleur jaune brillante.

Le Tableau1 présente quelques caractéristiques de cette plante.

**Tableau 1:** Quelques caractéristiques botaniques de *Thapsia garganica* (Pujadas, et Plaza, 2003).

Taille de la plante (cm)	54-110
Forme de fruit	elliptique
Fruit (mm)	15–22 x 10–17
Limbe (cm)	29-35 x 13-24
Forme de limbe	2 ou 3 pennatiséquées
Contour de lobe final	Linéaire:oblongue ou lancéolées
Apex de lobe final	Obtus spongiforme, mucroné
Face ventrale de limbe	glabre
Face dorsale de limbe	glabre, rarement subglabre
Couleur de la surface supérieure du limbe	verte
Couleur de la surface inférieure du limbe	Glaucous ou verte pâle
Couleur de pétales	jaune-foncé



**Figure 3:** Photographie illustrant le genre *Thapsia garganica* en pleine floraison (Photo prise le 14 avril 2017 à Tadmout, Laghouat )



**Figure 4:** Photographie illustrant les feuilles ,les racines(photos prises le 15 mars 2017) et les graines de *Thapsia garganica* (Photo prise le 10 juin 2017 à Tadmout, Laghouat )

### 3.2. Utilisations de *Thapsia garganica* en médecine traditionnelle et moderne

*Thapsia garganica* L est largement distribué dans tout le secteur méditerranéen et la Péninsule Ibérique. Sa résine cause une dermatite de contact et est utilisé par les Nord-Africains pour des raisons médicales (Makunga et *al.* , 2003).

Elle est connue par les Berbères et les Arabes dans le traitement des pathologies pulmonaires. Sa préparation est particulière : pour « l'engraissement », elle est préparée sous forme d'une pâte absorbée. Contre les douleurs et les problèmes pulmonaires, ils utilisent la racine qui est préparée souvent avec de l'huile pour frotter la partie malade du corps (Schmitt UW, 2005).

Les extraits de racines de *Thapsia garganica* ont été utilisés dans la médecine traditionnelle européenne et arabe pour le traitement des affections pulmonaires, rhume et le soulagement des douleurs rhumatismales (French, 1971 ). Ses extraits contiennent des irritants puissants de la peau, constituant une importante cause de dermatite de contact qui se manifeste par un érythème, des démangeaisons et la formation de petites vésicules. Les principaux composés actifs des extraits de racines, responsables de ces effets ont été identifiés par Christensen et *al.* (1981) comme étant des sesquiterpènes connus sous le nom de thapsigargine et thapsigargicine

*Thapsia garganica* est aussi utilisée par les Berbères contre les rhumatismes et les douleurs de sciatique (Youssef M Ait , 2006).

Les principaux composés bioactifs synthétisés par *Thapsia garganica* sont : thapsigargine , thapsigargin, notrilobolid et thapsivillosin .Des recherches scientifiques sur les activités biologiques de ces composés ont mené à l'identification du thapsigargin et du thapsigargin en tant qu'inhibiteurs sélectifs puissants de  $Ca^{2+}$ - ATPases dans le réticulum endo et sarco- plasmique des cellules animales. Une recherche Pharmacologique a également prouvé que ces thapsigargin ont une capacité de stimuler sélectivement les différentes cellules du système immunitaire (Makunga et *al.* , 2003)..

Hakii et autres (1986) ont identifié le thapsigargin comme non-ATP instigateur de tumeur dû à sa capacité de favoriser le deuxième stade de carcinogenèse par l'intermédiaire d'un mécanisme qui ne fait pas impliquer directement l'activité de la protéine kinase C (Makunga et *al.* , 2003)..

Aussi des études ont montré que thapsigargin et ses analogues induisent l'apoptose (mort cellulaire programmée) des cellules cancéreuses humaines et sont actuellement développées comme des agents thérapeutiques pour le traitement du cancer (Makunga et *al.* , 2003).

### 3.3. Toxicité de *Thapsia garganica*

Toute la plante est toxique par sa résine, jaune ou légèrement rougeâtre, rubéfiante et vésicante, particulièrement abondante dans l'écorce de la racine. (Hammiche, 2013)

Les intoxications animales ne sont pas rares, surtout pour les troupeaux nomadisant loin de leur aire naturelle de pâturages; ainsi, les chameaux qui confondent les jeunes pousses de *Thapsia* avec une Ombellifère saharienne (Avato, 2001; Perrot 1943). Les intoxications humaines sont toutes dues aux utilisations traditionnelles mal maîtrisées (Hammiche, 2013).

### 3.4. Travaux antérieurs

L'importance médicinale de *Thapsia garganica* a donné naissance à plusieurs études scientifiques pour l'étude des composés bioactifs synthétisés de cette plante. Les principaux travaux sont recueillis dans le Tableau 2.

Quelques chercheurs sont intéressés par la composition lipidique des graines de *Thapsia garganica*, comme Pinarosa Avatoil, qui a pu identifier l'acide pétrosélinique C18:1 $\omega$ 6 un isomère de l'acide oléique C18:1 $\omega$ 9. Cet acide gras est une source très intéressante pour la nourriture, cosmétique et pour l'industrie pharmaceutique (Avato et al., 2001). Alors que la plupart d'autres travaux se concentrent sur l'étude et l'extraction des composés actifs comme le thapsigargin, ainsi que des études botaniques liées à la révision taxonomique de l'espèce.

**Tableau 2:** Quelques travaux réalisés sur *Thapsia garganica*

Travail réalisé	Référence
Le genre <i>Thapsia</i> : une source d'acide pétrosélinique	Avato, et <i>al.</i> , 2001
Micro propagation de <i>Thapsia</i>	Makunga et <i>al.</i> , 2001
Caractérisation des chromosomes et l'étude de l'organisation du génome de <i>Thapsia garganica</i> L par localisation des gènes d'ARNr	Rasmussen et Avato, 1998
Des études sur l'espèce <i>Thapsia</i> (Apiaceae) de l'Afrique du nord	Pujadas-Salvaà et Plaza-Arregu, 2003
Lipides Cycliques de <i>Thapsia garganica</i>	Liu et <i>al.</i> , 2004
Effet de la thapsigargine sur les cellules du muscle cardiaque	Wrzosek et <i>al.</i> , 1992
Nouvelles approches expérimentales pour traiter le Cancer de la prostate	Cavarretta et <i>al.</i> , 2005
Activité antioxydante des extraits phénoliques de certaines plantes médicinales algériennes	Djeridane et <i>al.</i> , 2006
Flavonoïdes dans les fruits des Ombellifères	Harrone et Williams, 1971
Des plantes comme source d'agents anti-cancer	Cragg et Newman, 2005
L'isolement de phénylpropanoïdes cytotoxiques et un analogue supplémentaire de thapsigargine à partir <i>Thapsia garganica</i>	Liu et <i>al.</i> , 2006
Identification et caractérisation d'une kunzeaol synthase provenant de <i>Thapsia garganica</i>	Pickel et <i>al.</i> , 2012
Purification à grande échelle de Thapsigargin	Olivier et <i>al.</i> , 2013
Chimiodiversité des huiles volatiles de <i>Thapsia garganica</i> L.	Hassen et <i>al.</i> , 2015
La localisation et la caractérisation in vivo de <i>Thapsia garganica</i> CYP76AE2 indiquant un rôle dans la biosynthèse de Thapsigargin	Andersen et <i>al.</i> , 2017

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANDERSEN, Trine Bundgaard, MARTINEZ-SWATSON, Karen Agatha, RASMUSSEN, Silas Anselm, *et al.* Localization and in-vivo characterization of *Thapsia garganica* CYP76AE2 indicates a role in Thapsigargin biosynthesis. *Plant physiology*, 2017, vol. 174, no 1, p. 56-72.

AVATO, Pinarosa, FANIZZI, Francesco Paolo, et ROSITO, Isabella. The genus *Thapsia* as a source of petroselinic acid. *Lipids*, 2001, vol. 36, no 8, p. 845-850

CAVARRETTA, Ilaria TR, CULIG, Zoran, KLOCKER, Helmut, *et al.* Novel experimental therapeutic approaches for prostate cancer. *EAU Update Series*, 2005, vol. 3, no 4, p. 227-239.

CRAGG, Gordon M. et NEWMAN, David J. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of ethnopharmacology*, 2005, vol. 100, no 1-2, p. 72-79.

DJERIDANE, Amar, YOUSFI, Mohamed, NADJEMI, B., *et al.* Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food chemistry*, 2006, vol. 97, no 4, p. 654-660.

FRENCH, D. H. Biology and Chemistry of Umbelliferae. *Suppl. to the Botan. J. Linn. Soc*, 1971, vol. 64, p. 385-412.

GLIMN-LACY, Janice et KAUFMAN, Peter B. *Botany illustrated: introduction to plants, major groups, flowering plant families*. Springer Science & Business Media, 2006. p109.

HAMMICHE, Victoria, MERAD, Rachida, et AZZOUZ, Mohamed. *Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen*. Paris : Springer, 2013.

HARBORNE, J. B. et WILLIAMS, Christine A. Flavonoid patterns in the fruits of the Umbelliferae. *Phytochemistry*, 1972, vol. 11, no 5, p. 1741-1750.

HASSEN, Imed, M'RABET, Yassine, BELGACEM, Chaouki, *et al.* Chemodiversity of volatile oils in *Thapsia garganica* L.(Apiaceae). *Chemistry & biodiversity*, 2015, vol. 12, no 4, p. 637-651.

LIU, Huizhen, JENSEN, Kent Gunnertoft, TRAN, Linh My, *et al.*, Cytotoxic phenylpropanoids and an additional thapsigargin analogue isolated from *Thapsia garganica*. *Phytochemistry*, 2006, vol. 67, no 24, p. 2651-2658.

LIU, Huizhen, OLSEN, C.E., et CHRISTENSEN, S.B. Tethered lipids from *Thapsia garganica*. *J. Nat. Prod*, 2004, vol 67, p.1339-1340.

MAKUNGA, N. P., JÄGER, A. K., et VAN STADEN, J. Micropropagation of *Thapsia garganica* a medicinal plant. *Plant Cell Reports*, 2003, vol. 21, no 10, p. 967-973.

MORNET, J. B., et GASPARD J.B. *Dictionnaire étymologiques des mots François dérivés du grec*. Ed : Seconde édition, Paris., 1809.

OLLIVIER, Anthony, GROUGNET, Raphaël, CACHET, Xavier, *et al.* Large scale purification of the SERCA inhibitor Thapsigargin from *Thapsia garganica* L. roots using centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography B*, 2013, vol. 926, p. 16-20.

PALOMA, Filliat. *Les plantes de la famille des Apiacees dans les troubles digestifs*. 2012.

PERROT, Émile. *Matières premières usuelles du règne végétal: thérapeutique-hygiène-industrie*. Masson, 1943.

PICKEL, Benjamin, DREW, Damian P., MANCZAK, Tom, *et al.* Identification and characterization of a kunzeaol synthase from *Thapsia garganica*: implications for the biosynthesis of the pharmaceutical thapsigargin. *Biochemical Journal*, 2012, vol. 448, no 2, p. 261-271.

PUJADAS-SALVÀ, Antonio J. et PLAZA-ARREGUI, Laura. Studies on *Thapsia* (Apiaceae) from north-western Africa: a forgotten and a new species. *Botanical journal of the Linnean Society*, 2003, vol. 143, no 4, p. 433-442.

RASMUSSEN, Søren K. et AVATO, Pinarosa. Characterization of chromosomes and genome organization of *Thapsia garganica* L. by localizations of rRNA genes using fluorescent in situ hybridization. *Hereditas*, 1998, vol. 129, no 3, p. 231-239.

RASMUSSEN, U., CHRISTENSEN, S. Brogger, et SANDBERG, F. Phytochemistry of the genus *Thapsia*. *Planta medica*, 1981, vol. 43, no 12, p. 336-341.

SCHMITT UW., Communication au congrès nordic natural products meeting pharmacognosy and chemistry In phyto news, Phytothérapie, 2005, vol 5, p. 222-225

WRZOSEK, A., SCHNEIDER, H., GRUENINGER, S., *et al.* Effect of thapsigargin on cardiac muscle cells. *Cell Calcium*, 1992, vol. 13, no 5, p. 281-292.

YOUSSEF, Mohand Aït. *Plantes médicinales de Kabylie*. Ibis Press, 2006. p 313-316.

## Chapitre II

### *Étude de la fraction lipidique*



## RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

### 1. Lipides

Les lipides (du grec lipos : graisse) forment un groupe de différentes molécules qui se dissolvent facilement dans les solvants organiques mais très peu dans l'eau. Ils comprennent les graisses, les huiles ainsi que les phospholipides et les glycolipides qui constituent les bicouches membranaires. Les stérols et les molécules qui comportent une grande chaîne d'hydrocarbures tels que les pigments chlorophylliens ou les caroténoïdes, bien qu'ils soient chimiquement différents, sont considérés comme des lipides sur la base de leur solubilité (Hopkins, 2003)

### 2. Classification

Il existe plusieurs classifications pour cette famille de molécules, dont l'une des plus importantes est celle qui repose sur la structure; on distingue ainsi (Charpentieret *al.*, 2008) :

#### 2.1. Lipides vrais

Des esters d'acides gras et d'alcool. Ils sont saponifiables, c'est-à-dire qu'ils forment des savons lors de leur hydrolyse par une base forte en milieu alcoolique. Ils se subdivisent en lipides simples et lipides complexes(Charpentieret *a.*, 2008):

##### A) Lipides simples

Composés uniquement de carbone C, d'hydrogène H et d'oxygène O parmi ces lipides simples, nous trouvons les glycérides, les cériques et les stériques (Charpentieret *al.*, 2008).

- **Glycérides**

Des graisses neutres hydrophobes, insolubles dans l'eau, et dont le point de fusion est d'autant plus élevé que le taux d'acides gras insaturés entrant dans leur composition est plus faible, leurs principales propriétés chimiques sont dues aux fonctions esters, à la chaîne aliphatique de l'acide gras et, surtout, aux doubles liaisons.

Les glycérides sont donc des esters du glycérol et des acides gras. Ils sont présents dans la quasi-totalité des tissus de tous les êtres vivants. Ils sont particulièrement abondants dans le tissu adipeux, où ils constituent la principale forme de stockage des lipides (Charpentieret *al.*, 2008;Hopkins, 2003) .

- **Cérides**

Les cérides sont les principaux constituants des cires animales ou végétales. L'alcool estérifiant l'acide gras n'est plus de glycérol mais un alcool à longue chaîne. Les acides gras présents sont en général saturés, rarement insaturés et très rarement hydroxylés (Charpentier et *al.*, 2008; Alaiset *al.* , 2003).

Céride= acide gras + alcool à longue chaîne

- **Stérides**

Les stérides sont des esters d'acide gras et de stérol, ils se rattachent à l'enchaînement biochimique ayant pour base l'isoprène actif (Charpentieret *al.*, 2008; Alaiset *al.* , 2003).

Stéride= acide gras + stérol

## **B) Lipides complexes**

Les lipides complexes sont également dénommés hétérolipides, composés non seulement de carbone C, de l'oxygène O et de l'hydrogène H, mais aussi de l'azote N et du phosphore P. Ils comprennent essentiellement deux familles : les glycérophospholipides et les sphingolipides (Charpentieret *al.*, 2008).

- **Glycérophospholipides**

Les glycérophospholipides (Figure5), encore appelés phospholipides ou phosphoglycérides , résultent de l'association des acides gras et de l'acide phosphatidique (Charpentieret *al.*, 2008).

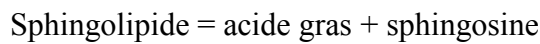
Glycérophospholipide = acide gras + acide phosphatique



Par opposition aux triacylglycérols, les glycérophospholipides sont des corps polaires leurs propriétés originales sont l'amphiphilie, miscibles à l'eau et solubles dans les lipides ils servent de lien physique entre les lipides et les constituants hydrosolubles comme les protéines (Frénot et Vierling, 2001).

- **Sphingolipides**

Les Sphingolipides sont des esters d'acide gras et de sphingosine qui est un alcool aminé à long chaîne. Ils sont également dénommés céramides e(Charpentieret *al.*, 2008).



La sphingosine est unie à un acide gras par une liaison amide pour former une céramide (Figure 7). La céramide est unie :

- Par une liaison ester à la phosphorylcholine (quelque fois la phosphoryléthanolamine) pour former les sphingomyélines ;
- par une liaison *O*-glycosidique à un ou plusieurs sucres pour former les sphingoglycolipides :
- Les cérébrosides dont le monosaccharide est souvent le galactose,
- Les gongliosides dont l'oligosaccharide est caractérisé par la présence d'acides sialiques (acide neuraminique N-acétylé ou N-glycosilé) (Moussard, 2004).

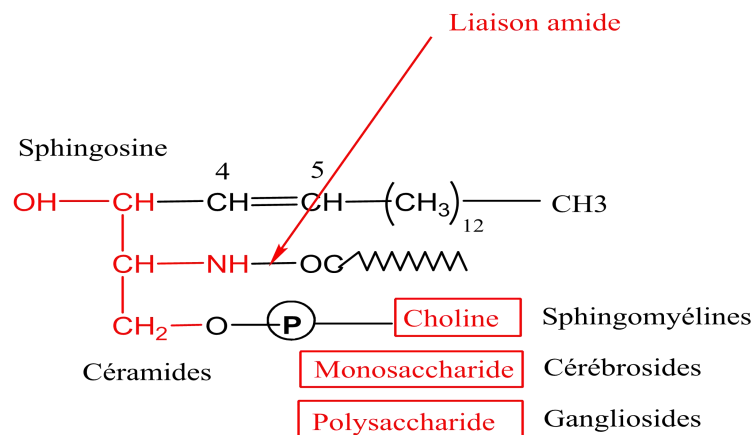


Figure 7: Structure des sphingolipides (Moussard, 2004).

## 2.2. Les composés à caractères lipidiques

Ce sont les composés naturels qui ne font pas partie des lipides vrais (liaison avec des acides gras, saponification) mais qui en possèdent la plus part des propriétés des lipides (physiques et chimiques), tout particulièrement la solubilité : insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques. Ils se divisent en icosanoïdes et isoprénoïdes (Charpentieret *al.*, 2008).

- **Icosanoïdes**

Dérivés d'un acide gras à 20 atomes de carbone: prostaglandines, leucotriènes, thromboxanes, ils jouent un rôle de médiateurs chimiques (Charpentieret *al.*, 2008).

- **Isoprénoïdes**

Appelés aussi lipides isopréniques, avec les terpènes (vitamines liposolubles, composés aromatiques d'huiles essentielles, hormones d'insectes) et les stéroïdes (le cholestérol, les acides biliaires, la vitamine D, les hormones stéroïdes). Ils sont synthétisés à partir de l'isoprène . (Charpentieret *al.*, 2008).

## 3. Données générales sur les acides gras

Ce sont des acides carboxyliques à nombre pair de carbone, à longue chaîne carbonée. Saturée ou non, la longueur de chaîne dépend du nombre d'atomes de carbone qui la constituent. On distingue les acides gras à chaîne courte (4 à 6 C), moyenne (8 à 12 C) et longue (plus de 20 C). La fonction acide réagit avec les alcools et les amines( Voet et *al.*, 2005). Ils sont rarement à l'état libre dans la nature, et se trouvent essentiellement sous forme estérifiée comme constituant majeur de lipides ( Cuvelier et *al.*, 2004)

Parmi les acides gras saturés, ceux en C12, C16 et C18 sont les plus largement distribués, alors que parmi les acides gras insaturés, ceux en C18 pourvus de 1, 2 ou 3 doubles liaisons sont les plus importants au sein du monde végétal et animal terrestre. Les acides gras à 4 ou plus de 4 doubles liaisons et 20 à 24 atomes de carbone sont quant à eux majoritaires dans le monde marin.

### 3.1. Acides gras saturés

La formule chimique générale des acides gras saturés est la suivante :  $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_n - \text{COOH}$ , leurs points de fusion augmentent avec la masse moléculaire (Cuvelier et al., 2004).

### 3.2. Acides gras insaturés

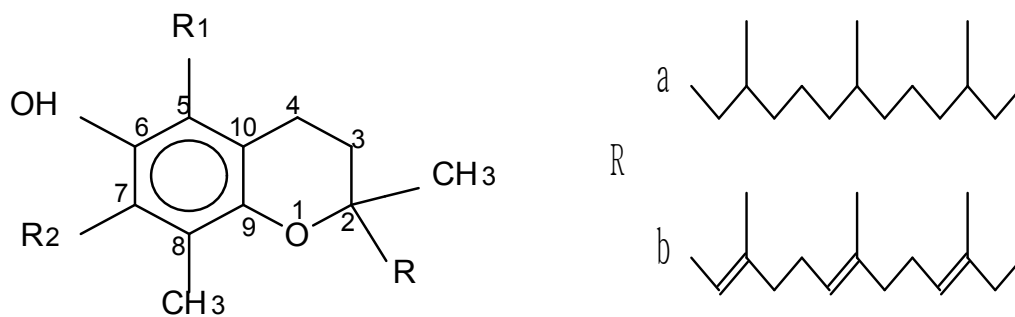
Les acides gras insaturés peuvent contenir entre 1 et 6 doubles liaisons et sont dits, selon le cas, mono insaturés ou polyinsaturés, les acides gras insaturés diffèrent donc entre eux non seulement par la longueur de la chaîne carbonée, mais aussi par le nombre, la position et la structure spatiale (cis, trans) des doubles liaisons (Cuvelier et al., 2004; Brisson, 1982.)

## 4. Données générales sur les tocophérols

Le nom tocophérols a été proposé pour la première fois en 1936 par Evans et ses collaborateurs. Ce nom provient du grec tokos pour progéniture et *pherein* pour porter. Cette famille comprend 4 substances : l' $\alpha$ -tocophérol, qui est la vitamine E proprement dite, le  $\beta$ -tocophérol, le  $\gamma$ -tocophérol et le  $\delta$ -tocophérol.

Ces composés ont, par ailleurs, beaucoup de similitudes structurales avec 4 autres molécules appartenant aux tocotriénols : l' $\alpha$ -tocotriénol, le  $\beta$ -tocotriénol, le  $\gamma$ -tocotriénolet et le  $\delta$ -tocotriénol.

Les tocophérols diffèrent entre eux par le nombre et les positions des groupes méthyles dans le cycle aromatique. Ils possèdent tous, en position 2, un groupe méthyle et une chaîne carbonée saturée ou insaturée. Si cette chaîne présente trois insaturations avec des configurations *trans*, les composés correspondants sont des tocotriénols (Figure 8) (Milcent et Chau, 2003; Cuvelier et al., 2003)



R1	R2	Structure	
		a	b
CH3	CH3	$\alpha$ -tocophérol	$\alpha$ -tocotriénol
H	CH3	$\beta$ -tocophérol	$\beta$ - tocotriénol
CH3	H	$\gamma$ -tocophérol	$\gamma$ - tocotriénol
H	H	$\delta$ -tocophérol	$\delta$ - tocotriénol

**Figure 8:** Structure des différents tocophérols et tocotriénols

Les tocophérols sont largement distribués dans les plantes, ce sont des produits huileux à température ordinaire, stables à l'action d'acide et au chauffage modéré .En revanche ils sont facilement oxydables. Les principaux rôles de tocophérols sont (Bourre, 2004 ):

- Ils neutralisent les formes actives et toxiques de l'oxygène ;
- Ils inhibent les radicaux libres ;
- Ils contribuent à maintenir l'intégrité et la stabilité des structures cellulaires.

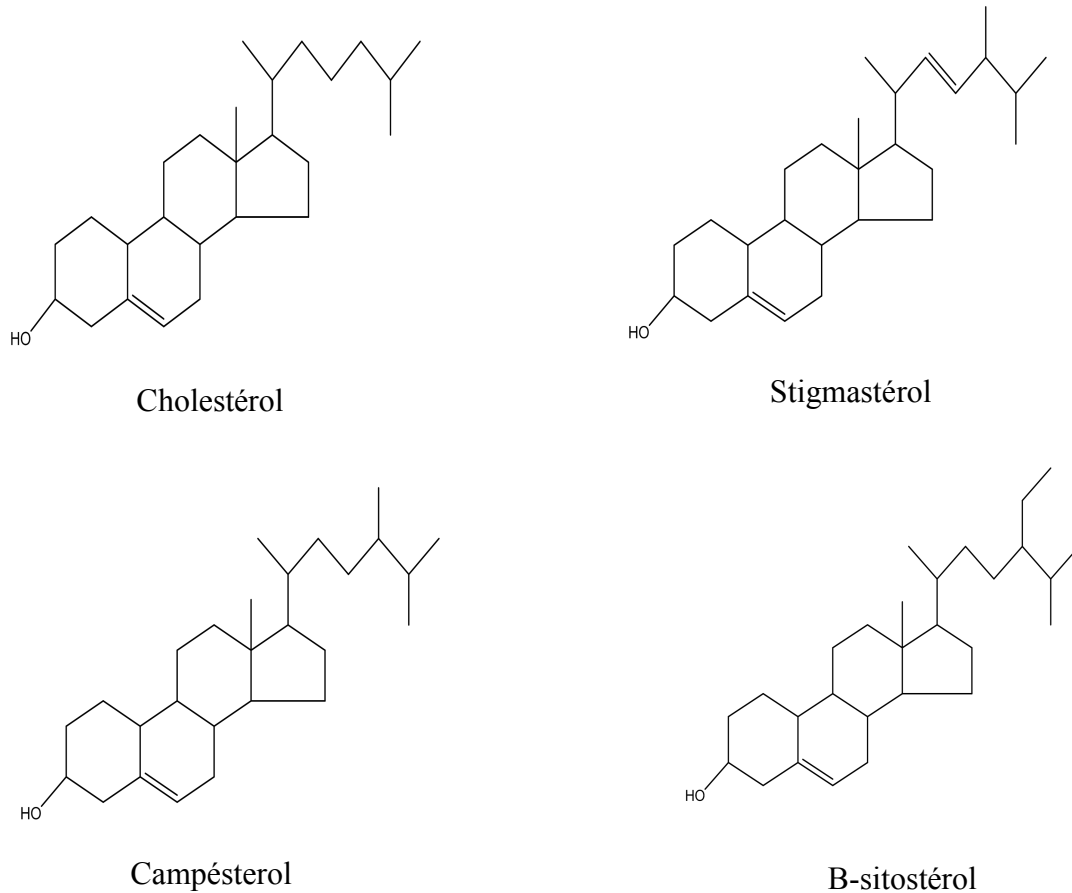
### 5. Données générales sur les stérols

Composés tétracycliques, avec 27 à 29 carbones, ils sont représentés uniquement par le cholestérol dans le règne animal, et par de très nombreuses variétés dans le règne végétal ils représentent environ 30 à 60 % des insaponifiables.

Les stérols végétaux (phytostérols) sont présents dans les lipides des plantes notamment dans les huiles de noix, de graines, de céréales et de fruits. Ils empêchent l'absorption de cholestérol présent dans les aliments en formant des précipités insolubles, non absorbés dans l'intestin (Frénot, 2001; Jacotot, 2003).

Le stérol le plus abondant dans le règne végétal est sans conteste le sitostérol suivi du campestérol, puis le stérgmastérol (Figure 9) (yousfi, 2005).

Le cholestérol longtemps considéré comme exclusivement animal a été mise en évidence chez de nombreux végétaux cependant en petite quantité par apport aux autres stérols (Behrman, 2005)



**Figure 9:** Structure des phytostérols (Frénot, 2001).



## MATERIEL ET METHODES

### 1. Préparation de la matière végétale

Dans le but d'étudier la fraction lipidique des graines, feuilles et racines de *Thapsia garganica*, nous avons réalisé la récolte à partir d'un champ spontané riche en cette plante situé dans la région de Tadjmout, wilaya de Laghouat (Figure10) . Pendant cette période nous avons suivi la croissance de la plante ,elle est caractérisée par un cycle végétatif court qui débute le mois de janvier et se termine le mois de juillet . Durant cette période ,*Thapsia garganica* reste intact parce qu'elle n'est pas touchée par les animaux qui passent par cette région .

Pour ce travail , la cueillette est réalisée le mois de mars pour les racines et les feuilles, et le mois de mai et Juin pour les graines immatures et matures respectivement. Cette opération doit être effectuée en prenant des précautions surtout pendant l'enlèvement des racines pour éviter toute dermatite de contact .



**Figure 10:** Photographie illustrant le champs de *Thapsia*  
(photos prises entre Mars et Juin 2017 à Tadjmout , Laghouat )

Indépendamment de la méthode utilisée, l'extraction des huiles comporte généralement diverses opérations préliminaires, telles que; le séchage, le nettoyage ,le décorticage et le broyage(Karleskind, 1992).

La matière végétale a été préparée de cette manière :

- Séchage à l'air, à l'ombre et à température ambiante pendant 2 mois (Figure11 );
- Séparation des graines des ombelles et enlèvement des impuretés ;
- Les ailes ont été séparées manuellement des graines (Figure 12) ;
- Les racines sont bien nettoyées et nous avons enlevé écorce (Figure13 );
- Les différentes parties sont finement broyées après séchage (Figure14) .



**Figure 11:** Photographie illustrant les feuilles, les graines et les racines de *Thapsia garganica* après séchage (photos prises le 20 juillet 2017)



**Figure 12:** Photographie illustrant les graines de *Thapsia garganica* avant et après l'enlèvement des ailes (photos prises le 20 juillet 2017)



**Figure 13:** Photographie illustrant les racines de *Thapsia garganica* après nettoyage (photo prise le 20 juillet 2017)



**Figure 14:** Photographie illustrant les différentes parties de *Thapsia garganica* après broyage

## 2. Extraction

L'extraction doit être totale et ne doit pas modifier la nature de la matière grasse. Elle a le plus souvent un double objectif :

- L'analyse de la matière grasse
- L'étude de l'activité antioxydante des huiles obtenues

L'extraction par solvant est la méthode la plus largement répandue pour l'obtention des huiles. Il s'agit d'une opération de transfert de matière engendrée par le contact entre un solide qui contient le soluté, et un solvant qui le solubilise (Karleskind, 1992). La solubilité des lipides est un critère important pour leurs extractions, elle dépend essentiellement de la nature du lipide, la proportion des lipides apolaires (principalement les triglycérides) et lipides polaires (phospholipides et glycolipides). Donc plusieurs solvants peuvent être employés en fonction de la nature et la composition de l'échantillon (Wrolstad et *al.*, 2005)

Dans le but d'étudier la fraction lipidique des graines de *Thapsia garganica*, nous avons adopté la méthode de l'extraction par Soxhlet avec l'utilisation de l'hexane comme solvant. L'extraction est réalisée pendant 24 h, et après filtration, le solvant est évaporé sous pression réduite à 45°C. Les extraits obtenus sont pesés et la teneur en huile a été calculée par la relation suivante :

$$\text{Teneur en huiles} = \left( \frac{\text{m de l'huile extraite}}{\text{m poudre végétale}} \right) \times 100$$

### 3. Décoloration

La décoloration est une opération qui vise à éliminer les pigments colorés. Elle fait intervenir un phénomène physique : l'adsorption sur des terres décolorantes, du charbon actif, des silices spéciales ou des combinaisons de ces substances (Karleskind, 1992)

### 4. Extraction des cires

Parmi les propriétés des cires est l'insolubilité dans l'alcool à froid (Fryer et weston, 1918). Les cires des différentes parties de *Thapsia garganica* sont extraites par solubilisation de toute la quantité obtenue dans un volume approprié d'éthanol et on laisse le mélange au réfrigérateur à 4°C pendant 24 heures, le mélange est ensuite filtré pour récupérer les cires.

## 5. Préparation des esters méthyliques des acides gras des différentes huiles de *Thapsia garganica*

Les acides gras sont des constituants essentiels des triglycérides, c'est par leur connaissance qu'on peut déterminer les caractéristiques d'identité des corps gras. Leurs analyses par CPG doivent être faites à l'état libre, donc ils sont préalablement transformés en dérivés, généralement des esters méthyliques (EMAGs) grâce à leurs polarités moyennes et à leurs volatilités. Cette technique permet de séparer les EMAGs en fonction de leur nombre d'atomes de carbone mais aussi en fonction du nombre et de la position des doubles liaisons, ainsi que d'éventuels groupes fonctionnels (Guingnard et al., 1985).

Dans ce travail, nous avons préparé les EMAG par la méthode recommandée par « International Union of Pure and Applied Chemistry », en présence d'un catalyseur acide, le trifluorure de bore ( $\text{BF}_3$ ) (Cocallemen et al., 1988). Le corps gras est dans un premier temps saponifié en présence de potasse méthanolique, l'estérification est ensuite réalisée en présence de  $\text{BF}_3$ / Méthanol (réactif prêt à l'emploi). Après addition d'eau, les esters sont récupérés à l'aide d'un solvant (Olle, 1996).

### 5.1. Saponification

Dans un ballon on pèse 2 g d'huile, on ajoute 20 ml de solution méthanolique de potasse (0,5N), celui-ci est adapté au réfrigérant, et porté à reflux pendant 1h30. puis on ajoute 20 ml d'eau distillée. La phase aqueuse basique contenant les acides gras, sous forme de sels de potassium est extraite 3 fois par 50 ml de diéthyl éther pour obtenir les insaponifiables.

### 5.2. Estérification

Le trifluorure de bore  $\text{BF}_3$  est l'un des catalyseurs les plus couramment utilisés pour la préparation des EMAG en raison de sa haute puissance d'estérification, bien que cela ne signifie pas nécessairement que ce réactif est le meilleur. En fait, le  $\text{BF}_3$  méthanolique est toxique, coûteux et relativement instables, et l'utilisation des solutions trop concentrées peut entraîner la perte de grandes quantités d'acides gras polyinsaturés (Carrapiso et García, 2000)

Les acides gras, dissous dans la phase aqueuse sous forme de sels de potassium, sont régénérés par addition d'une solution d'acide chlorhydrique à 10%. Ils sont ensuite extraits par trois lavages avec 50 ml de dichlorométhane. La phase organique obtenue est lavée à l'eau distillée, séchée par le sulfate de sodium anhydre et évaporée sous pression réduite. Ensuite, les acides gras obtenus sont mis en solution dans 10 ml d'une solution méthanolique de trifluorure de bore à 10 %, et portés à reflux pendant 10 min. Après refroidissement ( presque 5 minutes), on ajoute 20 ml d'eau distillée. Les esters méthyliques sont extraits par trois lavage par 20 ml de diéthyléther. La phase obtenue est lavée plusieurs fois à l'eau distillée, séchée par sulfate de sodium anhydre puis évaporée sous pression réduite. Les esters méthyliques (EMAGs) ainsi obtenus sont conservées au réfrigérateur à 4°C.

### 5.3.Analyse des esters méthyliques par CG/SM

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique très répandue, dont les premières applications sont maintenant vieilles plus de 60 ans, sur des composés qui doivent être à l'état gazeux, l'échantillon est injecté en tête de la colonne, l'élution est assurée par un flux de gaz inerte qui sert de phase mobile, contrairement à la plupart des autres types de chromatographie, il n'y a pas interaction entre les molécules analysées et la phase mobile (Rouessac et *al.*, 2004).

L'analyse des acides gras après estérification a été effectuée par un couplage Chromatographie en Phase Gazeuse/Spectrométrie de Masse (CG/SM). Lors de cette analyse, nous avons utilisé un chromatographe: 1 HP 5890 série II, La séparation a été faite sur une colonne capillaire de silice de 60 m de longueur et 0.25 mm de diamètre, sur laquelle est greffée une phase stationnaire DB-Wax avec 0.2µm d'épaisseur. L'analyse a été faite en programmation de température et par l'utilisation d'hydrogène comme gaz vecteur.

## 6. Extraction des insaponifiables

Les insaponifiables sont un mélange complexe qui contient des composés non glycéridiques extractibles par les solvants peu polaires après une hydrolyse alcaline des huiles, ils sont connus par leurs activités biologiques importantes comme les pigments et les vitamines solubles (vitamine A, vitamine E).

## **6.1. Protocole**

Dans un ballon on pèse 2 g d'huile, on ajoute 20 ml de solution méthanolique de potasse (0,5N), celui-ci est adapté au réfrigérant, et porté à reflux pendant 1h30 . puis on ajoute 20 ml d'eau distillée. La phase aqueuse basique contenant les acides gras, sous forme de sels de potassium est extraite 3 fois par 50 ml de diéthyl éther pour obtenir les insaponifiables.

La fraction organique obtenue après saponification est séchée par sulfate de sodium anhydre, filtrée puis évaporée sous pression réduite. On obtient ainsi la fraction insaponifiable. Le rendement en composés insaponifiables est obtenu par pesée du contenu du ballon après évaporation sous pression réduite

## **7. Étude des tocophérols**

L'activité en vitamine E est la résultante naturelle de 8 molécules dont les structures dérivent de celles des tocophérols et les tocotriénols. Chaque vitamère a une activité vitaminique différente, comparée à celle de l' $\alpha$ -tocophérol qui est considérée comme la forme primaire la plus active ( Greenfield et Southgate, 2007)

La méthode d'analyse préférée est par conséquent celle qui sépare et mesure les différents vitamères. Les méthodes colorimétriques s'appuyant sur la réaction d'Emmerie Engel et la réduction du chlorure ferrique mais aussi sur la réaction avec 4,7-dipyridine ou 4,7-diphénanthroline. Les complexes formés sont plutôt instables et donnent une valeur des tocophérols totaux .La méthode colorimétrique a été remplacée d'abord par le CPG, puis par la CLHP qui est maintenant la méthode préférée ( Greenfield et Southgate, 2007).

### **7.1.Dosage spectrophotométrique des tocophérols totaux:**

#### **7.1.1.Principe:**

La méthode adoptée pour ce dosage est celle d'Emmerie-Engel (Emmerie et Engel, 1939). Cette méthode colorimétrique est basée sur la réaction d'oxydoréduction entre les tocophérols et le fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ) qui est réduit en fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ). Ce dernier, en présence phénantroline forme un complexe rouge-orangé stable dont le coefficient d'extinction molaire à 510 nm est très élevé.



### 7.1.2. Protocole:

Une droite d'étalonnage est tracée à partir du tocophérol commercial, permet de relier la densité optique et la concentration de tocophérol exprimée en g/l . À partir d'une solution commerciale de la vitamine E (0.6 g/l) , nous avons préparé dans l'hexane différentes dilutions . Par la suite, 1ml de réactif phénantroline et 0.5ml FeCl<sub>3</sub> (solutions éthanoliques) sont ajoutés à 1 ml de chaque solution fille . Après 3min on mesure l'absorbance à 510 nm.

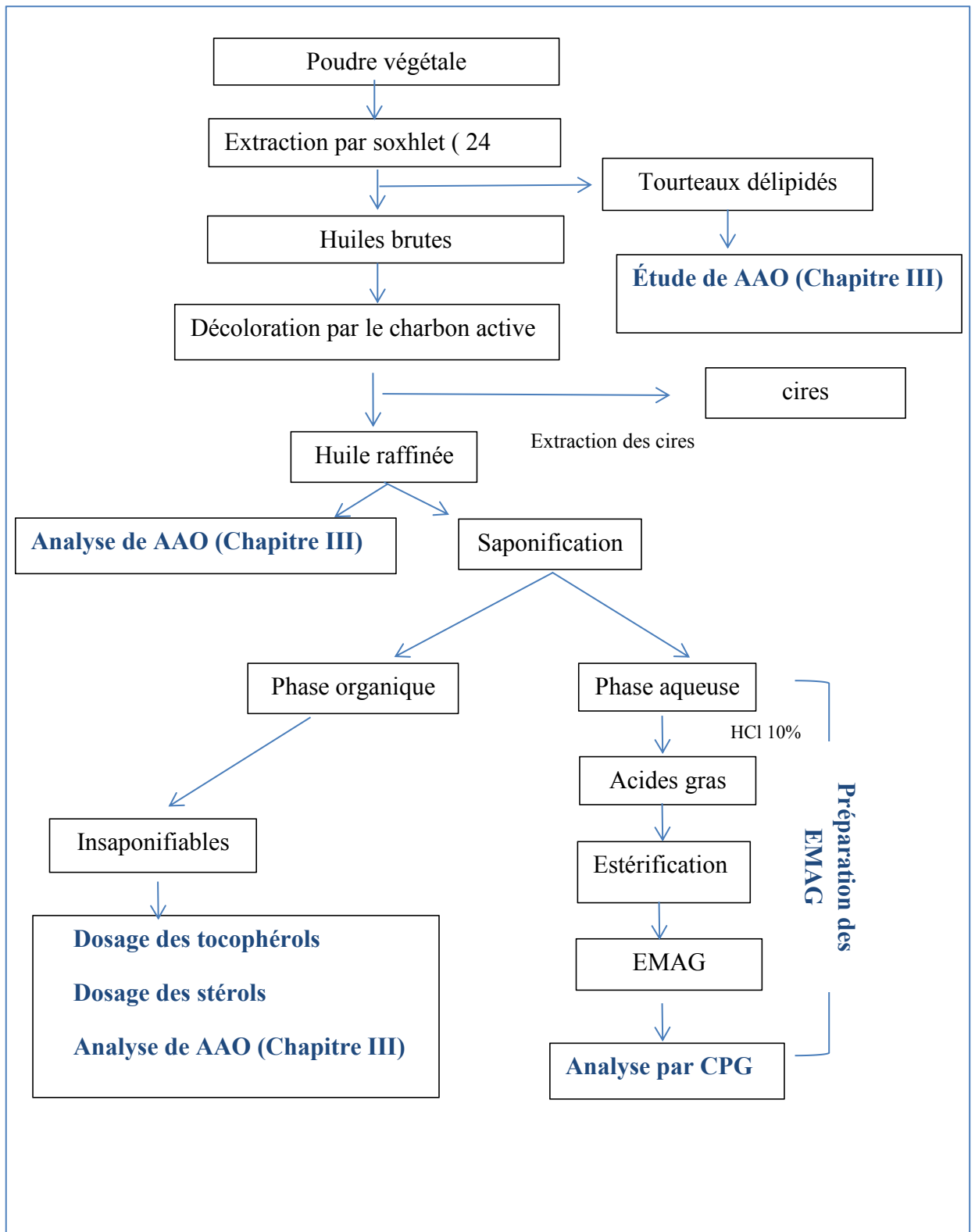
Le contenu en tocophérols totaux dans les huiles de *Thapsia garganica* est déterminé de la même façon en répétant ce test trois fois pour chaque échantillon . La concentration en tocophérols est obtenue à partir de la courbe d'étalonnage, en équivalant de vitamine E par 100 d'huile .

## 8. Dosage des stérols

Nous avons utilisé une méthode colorimétrique basée sur l'absorption spectrophotométrique suivant le test de Liebermann-Burchard (Naudet, 1986; Barreto et Carma, 2005), basé sur une réaction colorée spécifique des 3  $\beta$ -hydroxystéroïdes possédants une double liaison en position 5-6. Les stérols forment un complexe stable avec l'anhydride acétique en milieu acide qui absorbe dans le visible à une longueur d'onde de 550 nm.

À partir d'une solution chloroformique de cholestérol de différentes concentrations, nous avons tracé une courbe d'étalonnage du cholestérol . On prend 1ml de chaque solution et on lui ajoute 2 ml du réactif de Liebermann, puis on laisse la coloration se développer et se stabiliser pendant 25 minutes à l'obscurité.

Le travail réalisé dans ce chapitre est résumé dans la Figure ci dessous.



**Figure 15:** Organigramme présentant la démarche expérimentale pour l'étude de la fraction lipidique de *Thapsia garganica*

## RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

### 1. Rendement d'extraction et propriétés des huiles obtenues

Les teneurs en huile dans les différentes parties de *Thapsia garganica* sont représentées dans la figure ci dessous.

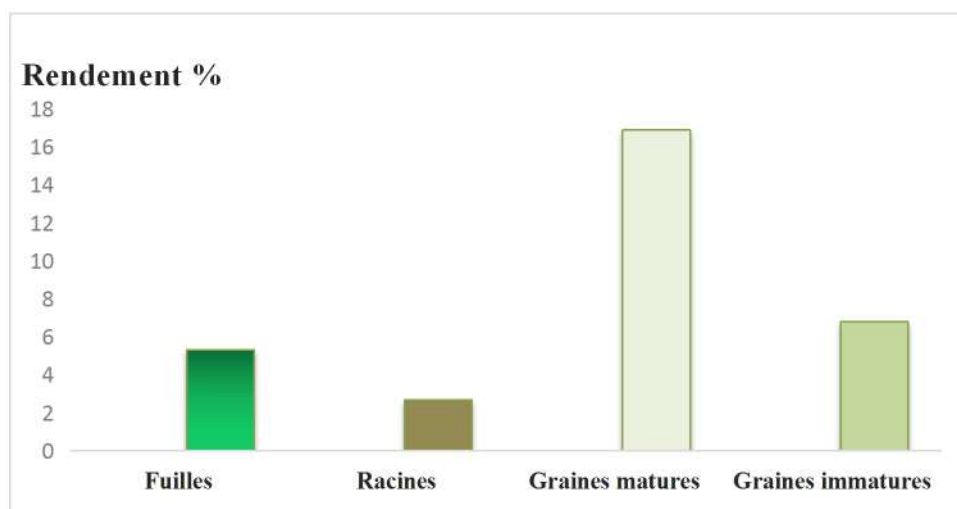


Figure 16: La teneur en huiles des différentes parties de *Thapsia garganica*

Tableau 3: Teneurs en Insaponifiables , cires et les propriétés des huiles de *Thapsia garganica*

	Feuilles	Racines	Graines matures	Graines immatures
<b>Teneur (%)</b>	5,32	2,70	16,90	6,81
<b>Couleur</b>	Vert foncé	Vert olive	Verte	Vert clair
<b>Odeur</b>	piquante	boisée	piquante	piquante
<b>Aspect</b>	moelleux	Liquide visqueux	Liquide	Liquide
<b>Cires(%)</b>	4,6	0,93	2,25	1,2
<b>Insaponifiables (%)</b>	21,65	44,13	6,43	10,86

Il est clair qu'il y a une grande différence entre les teneurs en huile des différentes parties de *Thapsia garganica* (Figure 16 et Tableau 3), ainsi le meilleur rendement est obtenu pour les graines matures, avec une teneur en huile qui est supérieure au double à celle des graines immatures et au triple à celle des feuilles, alors que les racines ont le rendement le plus faible. Ceci revient principalement à la différence entre les fonctions des différentes parties au sein de la plante, car les graines sont connues comme source principale de stockage des huiles végétales.

La quantité d'huile trouvée dans les graines matures de *Thapsia garganica* (16,9 %) est supérieure à celle de la région de Sidi Makhoul récoltées en 2009 et obtenue par une macération à froid avec l'éther de pétrole (9,45%). Cette différence peut être due à plusieurs facteurs comme la région, la polarité de solvant et à la méthode d'extraction utilisée. De même, on remarque à partir de cette étude que la teneur en huile des graines étudiées est faible par rapport aux autres graines oléagineuses, comme le tournesol (30-35%) soya (18-22%) et l'olive (15-50%) (FAO, 1993). La teneur en huile des graines de *Thapsia garganica* est aussi faible par rapport à d'autres graines oléagineuses et fruits locaux étudiés dans notre laboratoire, comme les fruits de *Pistacia atlantica* (33.67 %) (Bentireche et al., 2018), et l'arganier (39,5%) (Yousfi et al., 2009).

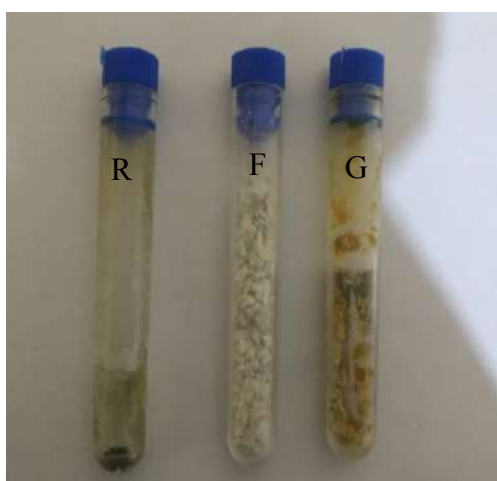
Comparons nos résultats avec ceux obtenus pour d'autres espèces de la même famille, on peut dire que les graines de *Thapsia garganica* sont plus riches en huile que plusieurs autres graines de la même famille à savoir *Cuminum cyminum* L., *Carum carvi* L., *Foeniculum vulgare*, *Pimpinella anisum* Linn, et similaire à d'autres comme *Anethum graveolens* L. et *Coriandrum sativum* L (Sayed-Ahmad et al., 2017).

Dans cette étude, les différences observées entre les propriétés des huiles des feuilles, racines et graines de *Thapsia garganica* (Tableau 3), indiquent fortement une différence dans la composition de ces huiles, ainsi les huiles des feuilles ont un aspect mou avec une coloration vert foncé et une odeur piquante, les huiles des graines sont liquide, de coloration verte et avec une odeur piquante, alors que l'huile de racine est visqueuse avec une odeur spéciale qui ressemble à l'odeur de bois.

La teneur en insaponifiables dans les huiles des graines de *Thapsia garganica* est de 6,43% à 10,86% pour les graines matures et immatures respectivement . Ces valeurs sont plus importantes que celles des huiles de plusieurs graines oléagineuses comme le palme, le tournesol et l'arganier (Yousfi et *al.*, 2009), mais ils appartiennent à l'intervalle des plantes connues par leurs richesses en insaponifiables comme l'avocat et la Karité, c'est pour ça, une analyse approfondie et détaillée de la composition des insaponifiables de ces huiles sera intéressante.

Généralement, les insaponifiables forment une fraction minoritaire dans les huiles des graines et fruits, mais nous n'avons pas trouvé des études concernant les teneurs en insaponifiables dans les huiles des feuilles et des racines des plantes . Dans cette étude, nous avons trouvé des quantités très importantes dans les feuilles et les racines de *Thapsia garganica* (21,65% et 44,13%) respectivement , mais vu le nombre faible des échantillons, on ne peut pas tirer des conclusions sur l'origine de ces concentrations élevées.

L'un des résultats obtenus dans ce travail et qui confirme aussi la diversité de la composition en matière grasse des différentes parties de *Thapsia garganica*, est la nature et la teneur en cire dans les différentes huiles étudiées, ainsi les feuilles ont donné une poudre blanche alors que les cires des racines et graines sont moelleuses et vertes (Figure17). Les cires végétales sont généralement produites et localisées à la surface des parties aériennes des plantes, au niveau de leur cuticule. Cette dernière constitue une véritable interface entre les plantes et leur environnement et remplit diverses fonctions physiologiques et écologiques (Shepherd et Wynne ,. 2006), ceci explique peut-être la richesse en cire de la partie aérienne de *Thapsia garganica* par rapport aux racines .



**Figure 17:** Photographie illustrant les cires des feuilles ,racines et graines  
de *Thapsia garganica*

## 2. Analyse des esters méthyliques par CG/SM

La préparation et les analyses des EMAG par CG/SM sont réalisées de la même façon pour les quatre échantillons . Les temps de rétention sont en fonction de la masse moléculaire (longueur de chaîne), le nombre et la localisation des doubles liaisons. Les résultats de ces analyses sont représentés dans les chromatogrammes ci-dessous. Chaque EMAG d'huile a été identifiée par comparaison de son temps de rétention et son spectre de masse avec celui des standards.

À partir de ces chromatogrammes (Annexe1), nous avons dressé le Tableau 4 qui indique les proportions relatives des divers acides gras des huiles brutes des différentes parties étudiées

Tableau 4: Composition relative en acides gras des huiles de *Thapsia garganica*

Acide gras	LF	LR	LG im	LGm
C12:0	1,07	/		1,01
C14 :0	1,09/	/		/
C16 : 0	6,36	11,45	9,85	3,70
C16 : 1	/	2,62	0,95	/
C18 : 0	/	1,2	1,69	/
C18 : 1	3,9	11,13	30,15	84,01
C18 : 2	15,01	31,52	28,67	10,53
C18 :3 $\omega$ 3	15,81	3,51	9,43	/
C20 :0	35,85	1,26	0,73	/
C20 :1	/	0,54	0,67	/
C22:0	/	2,28	/	/
C22 :2	/	4,90	1,40	/
<b><math>\Sigma</math>AGS</b>	53,30	16,19	12,27	4,71
<b><math>\Sigma</math> AGI</b>	34,72	54,22	71,27	94,54
<b>AGI/AGS</b>	0,65	3,34	5,81	20,07

D'après ces résultats, les huiles des graines et des racines de *Thapsia garganica* sont caractérisées par une teneur élevée en acides gras insaturés avec des rapports AGI/AGS de 5.81 et 3.34 successivement, alors que les feuilles sont caractérisées par une teneur importante d'acides gras saturés. Cette différence entre les proportions des acides gras insaturés explique bien les différences entre les propriétés des trois huiles, ainsi les huiles des graines avec le rapport AGI/AGS le plus élevé, sont sous forme liquide (Tableau 3)

On remarque aussi qu'il n'y a pas de similitude entre les profils en acide gras des trois organes, les racines contiennent un grand pourcentage d'acide C18:2 suivi par les acides C18:1 et C16: en quantités proches et des valeurs importantes en acides gras C20:0, C22:0 C22:2, C16:1. Alors que les feuilles contiennent majoritairement l'acide C20:0, suivi par des valeurs proches en acides C18:3 et C18:2 et un pourcentage important de l'acide C12:0, mais d'un faible contenu en acide C18:1 et C16:0. *Thapsia garganica* contient en plus des acides gras habituels, l'acide C17:1, identifié seulement dans les feuilles.

A la différence des graines, les feuilles sont riches en lipides chloroplastiques en raison de leur teneur élevée en pigments, représentant environ un tiers de l'extrait, et en lipides complexes (glycolipides et phospholipides) (Hudson, 1977), alors que les TAG représentent moins de 1% des glycérolipides totaux dans les feuilles en situation optimale de croissance (Tjellström et al., 2015). Les racines contiennent en grande majorité (à plus de 86 %) des phosphoglycérolipides, qui participent fortement à l'élaboration des membranes lipidiques des organites tels que les mitochondries (Caiveau et al., 2001 ; Jouhet et al., 2004).

Afin de faire une comparaison avec des études déjà réalisées sur la composition en acides gras des huiles des racines et feuilles, nous avons fait des recherches mais malheureusement, la plupart des études sur les huiles végétales sont liées aux huiles des graines. Les analyses des huiles des racines et feuilles de *Thapsia garganica* montrent que ces huiles ont des profils spécifiques et différents à ceux rencontrés habituellement dans les huiles végétales (contiennent majoritairement des acides C18:1, C18:2 et C16:0)

À l'issue de plusieurs travaux réalisés sur les huiles de la famille d'Apiacées, les résultats montrent la présence de l'acide pétrosélinique (Figure 19) isomère de l'acide oléique en grande quantité (supérieur à l'acide oléique) dans les membres de cette famille.



Cet acide gras est une source très intéressante pour la nourriture, cosmétique et de l'industrie pharmaceutique (Ngo-Duy1, 2008; Avato et *al.*, 2001).



**Figure 18:**L'acide pétrosélinique

Pinarosa Avato *et al.*, 2001 montrent dans leur étude réalisée sur plusieurs espèces issues de genre *Thapsia*, qu'il existe deux isomères de l'acide oléique dans cette huile le C18:1 $\omega$ 12 C18:1 $\omega$ 7 et que *Thapsia garganica* contient 82.8 % de l'acide pétrosélinique et 4,4 % de l'acide oléique. La séparation entre les deux acides oléique et pétrosélinique par CPG indique que dans une phase stationnaire polaire, ces deux isomères possèdent des longueurs de chaîne équivalente LCE qui diffèrent entre 0,04 à 0,06 unité de carbone, théoriquement cette différence conduit à certaines séparations entre les deux acides gras, mais cette résolution est en fonction des conditions opératoires (Sébédio et *al.*, 1995). Ainsi Wolff et Vandamman ont séparé partiellement entre ces deux acides gras par l'utilisation d'une colonne capillaire CP Sil 88 (100% cyanopropyl polysiloxane, 50m x 0,25 mm et 0,2  $\mu$ m d'épaisseur) (Sébédio et *al.*, 1995)

Plusieurs données bibliographiques confirment la présence de l'acide pétrosélinique en grande quantité dans les huiles des plantes issues de la famille d'Apiacées, de genre *Thapsia* et de l'espèce *Thapsia garganica*. Dans notre travail, nous avons constaté la présence des deux isomères oléique et pétrosélinique dans l'huile des graines matures sous forme de deux pics adjacents. (Figure 21), et le pourcentage en acide gras C18 : 1 dans cette huile est déterminé par la somme des pourcentages des deux pics, correspondants aux deux isomères. Pour les huiles des racines et des feuilles, cet acide gras, est représenté par un seul pic combinant les deux acides gras oléique (C18:1 $\omega$ 9) et pétrosélinique (C18:1 $\omega$ 12) sans savoir le pourcentage de chaque acide gras.

À notre connaissance il n'y a que deux études publiées sur la composition de l'huile des gaines de *Thapsia garganica*; celle de Pinarosa Avato *et al.*, 2001 et celle de Tlili *et al.*, 2015). Le Tableau 5 regroupe les résultats obtenus par les deux travaux ainsi que nos résultats.

**Tableau 5 :** Composition relative en acides gras de l'huile de fruit *Thapsia garganica*

Acide gras	C16 : 0	C16 : 1	C18 : 0	C18:1 $\omega$ 12	C18:1 $\omega$ 9	C18 : 2	C18 : 3
Graines im	9,85	0,95	1,69	30,15		28,67	9,43
Graines m	3,70	/	/	63,91	20,11	10,53	/
Tlili <i>et al.</i> , 2015	7,5	0,75	2,07	76,4		11,98	0,82
Avatoa <i>et al.</i> , 2001	4,9	/	traces	82,8	4,4	7,9	/

D'après ce Tableau, il y a une variation notable dans la composition en acides gras entre les huiles des graines immatures et mures de *Thapsia garganica*. Ainsi le taux de l'acide C 18:1 est presque doublé, l'acide linoléique et l'acide palmitique ont diminué plus de la moitié avec une disparition des deux acides palmitolique et linoléique. Ces résultats sont étayés par plusieurs autres études, ainsi une étude réalisée sur l'évolution saisonnière de la composition de *Stipa tenacissima L* en acides gras réalisée par Zoheir Mehdadi *et al* montre qu'entre le printemps et l'été on peut remarquer une diminution dans le taux de l'acide linoléique de 4,9 % jusqu'à 0% (Mehdadi *et al.*, 2006), aussi Trabelsi *et al.*, 2012 ont rapporté un taux relativement élevé, lors des stades précoces de la maturation de l'acide linoléique et linoléique.

En comparant nos résultats avec celles trouvés par les deux autres travaux, on peut dire que la composition en huiles trouvée dans notre étude est proche à celle trouvée par Pinarosa Avato. Cependant, dans les trois études, les acides gras insaturés occupent toujours une grande proportion.

### 3. Analyse des Tocophérols

Nous avons effectué le dosage des tocophérols à partir des insaponifiables, et le taux en tocophérols totaux est déterminé à partir de la courbe d'étalonnage de la vitamine E (Figure 23). Pour les échantillons d'huiles, le contenu en tocophérols est calculé par l'utilisation de rendement en insaponifiables et exprimé en g équivalents Vit E par 100g d'huile (Tableau 6).

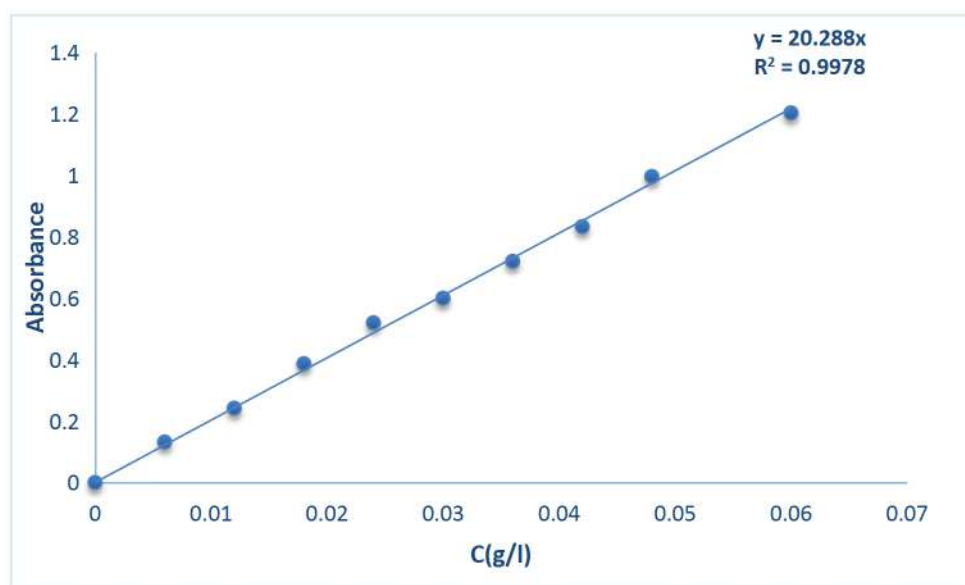


Figure 19: Courbe d'étalonnage de la vitamine E

Tableau 6: Quantités des tocophérols dans les huiles de *Thapsia garganica*

	Tocophérols totaux (g/100g d'insapo)	Tocophérols totaux (g/100g d'huile)
<b>Feuilles</b>	1,12 ±0;02	0,24 ±0,00
<b>Racines</b>	1,19 ±0;04	0.52 ±0,02
<b>Graines m</b>	2,19 ±0;04	0.14 ±0,00
<b>Graines im</b>	0,84 ±0;05	0.09 ±0,00

Comme le montre le Tableau 6, les huiles des graines de *Thapsia garganica* ont un niveau élevé de tocophérols totaux surtout dans les graines matures, ce qui leur confère une bonne stabilité oxydative.

La teneur totale en tocophérols dans l'huile des graines matures de *Thapsia garganica* (1400 mg/kg et l'huile) est relativement plus élevée que celles rapportées dans la littérature pour d'autres graines oléagineuses comme ; le coton (380-1200 mg / kg d'huile), maïs (330-3720 mg / kg d'huile), l'olive (114 mg / kg d'huile), noix de coco (moins de 50 mg / kg d'huile), l'arachide (170-1300 mg/kg), l'huile de palme (150-1500mg / kg d'huile)( Codex stan 210, 1999) et de l'arganier 1027,8 mg/kg (Yousfi et al., 2009)

Les quantités des tocophérols trouvées dans les feuilles et les racines, qui sont les plus riches en insaponifiables, étaient supérieures à celles trouvées dans les graines. Ces résultats peuvent être utiles pour des applications pharmaceutiques et thérapeutiques de ces huiles. Les différences observées entre les quantités totales des tocophérols des huiles des différentes parties peut-être liées aux différences morphologiques et fonctionnelles.

#### 4. Analyse des stérols

Nous avons effectué le dosage des stérols à partir des insaponifiables, et le taux en stérols totaux est déterminé à partir de la courbe d'étalonnage de cholestérol (Figure 20). Pour les échantillons d'huiles, le contenu en stérols est calculé par l'utilisation de rendement en insaponifiables et exprimé en g équivalent de cholestérol par kg d'huile. Les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau 7 (Chaque dosage a fait l'objet de 3 répétitions)

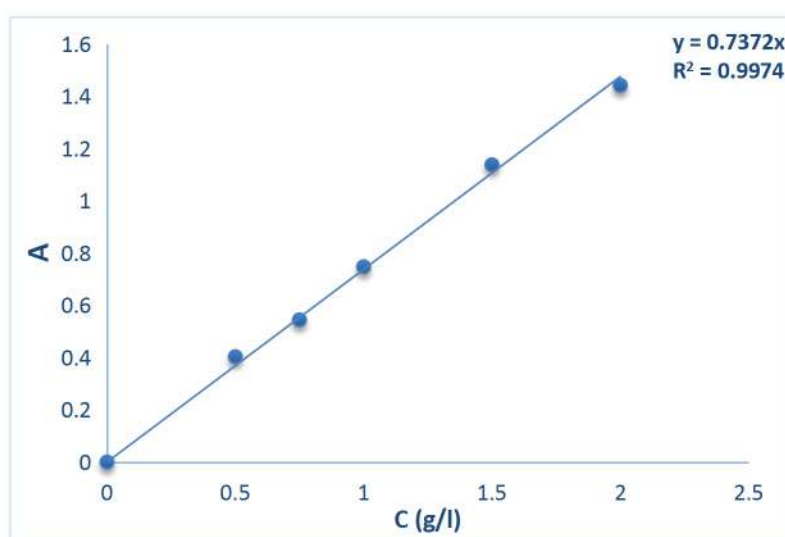


Figure 20: Courbe d'étalonnage du cholestérol

**Tableau 7:** Quantité des stérols dans les huiles de *Thapsia garganica*

	Stérols totaux (g/Kg d'insapo)	Stérols totaux (g/Kg d'huile)
<b>Feuilles</b>	42,98±5.5	9,31±1.2
<b>Racines</b>	21,99±5.0	9,70±2.2
<b>Graines m</b>	6,43±4.4	6,84±0.3
<b>Graines im</b>	10,86 ±3.2	6,80±0.2

D'après ces résultats on remarque que les huiles des feuilles et des racines de *Thapsia garganica* ont des taux similaires en stérols . Les graines matures et immatures ont aussi des taux très proches et inférieurs à ceux notés dans les feuilles et les racines. Comparons ces résultats avec les concentration en stérols dans les huiles de plusieurs cultures végétales comme le maïs (7000-22100 mg / kg d'huile) , noix de coco (400-1200 mg / kg d'huile), l'arachide (900-2900 mg/kg d'huile),le palme (300-700mg / kg d'huile) ( Codex stan 210, 1999), on constate que les huiles des différentes parties de *Thapsia garganica* contiennent des quantités assez importantes des stérols, mais les valeurs obtenues sont toujours dans la gamme des huiles végétales.

### Conclusion:

L' étude des huiles des graines, feuilles et racines de *Thapsia garganica* a permis de détecter la présence de l'acide pétrosélinique, un isomère de l'acide oléique largement présent dans les huiles de ce genre. Ces huiles sont caractérisées par différents profils en acides gras, ainsi les huiles des feuilles sont plus riches en acide arachidique (C:20) et linoléinique, les huiles des racines contiennent majoritairement l'acide linoléique, alors que les graines sont riches en acides pétrosélinique et linoléinique. Toutes les huiles étudiées sont caractérisées par des proportions importantes en acides gras insaturés.

Le dosage des tocophérols et des stérols dans les insaponifiables des différentes huiles étudiées, révèle que les huiles de *Thapsia garganica* sont riches en tocophérols, ce qui leur confère une aptitude longue à la conservation et une action vitaminique indéniable, comme elles peuvent constituer une source privilégiée de phytostérols, notamment pour les huiles des feuilles et des racines.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALAIS, Charles, LINDEN, Guy, et MICLO, Laurent. Lipides. In biochimie alimentaire. Dunod, Paris, 2003, p51-71.
- AVATO, Pinarosa, FANIZZI, Francesco Paolo, et ROSITO, Isabella. The genus *Thapsia* as a source of petroselinic acid. *Lipids*, 2001, vol. 36, no 8, p. 845-850.
- BARRETO, M. Carmo. Lipid extraction and cholesterol quantification: A simple protocol. *Journal of chemical education*, 2005, vol. 82, no 1, p. 103.
- BEHRMAN, E. J. et GOPALAN, Venkat. Cholesterol and plants. *Journal of chemical Education*, 2005, vol. 82, no 12, p. 1791.
- BENTIRECHE, Fatna, GUENANE, Hamid, et YOUSFI, Mohamed. Fatty Acids, the Unsaponifiable Matter, and Polyphenols as Criteria to Distinguish Pistacia atlantica Unripe Fruit Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2019.
- BOURRE, Jean-Marie. Vérité sur les oméga-3 (La). Odile Jacob, 2004.
- BRISSON, Germain. *Lipides et nutrition humaine: analyse des données récentes sur les corps gras alimentaires*. Presses Université Laval, 1982.
- BRISSON, Germain. Lipides et nutrition humaine: analyse des données récentes sur les corps gras alimentaires. Presses Université Laval, 1982. p 1-34.
- CAIVEAU, Olivier, FORTUNE, Dominique, CANTREL, Catherine, *et al.* Consequences of  $\omega$ -6-Oleate Desaturase Deficiency on Lipid Dynamics and Functional Properties of Mitochondrial Membranes of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, vol. 276, no 8, p. 5788-5794.
- CARRAPISO, Ana I. et GARCÍA, Carmen. Development in lipid analysis: some new extraction techniques and in situ transesterification. *Lipids*, 2000, vol. 35, no 11, p. 1167-1177.
- CHARPENTIER, Brigitte, HAMON-LORLEACH, Florence, HARLAY, Alain, *et al.* Guide du préparateur en pharmacie. Elsevier Masson, 2008. p153-234.
- COCALLEMEN, S., FARINES, M., FAILL, H., *et al.* Study of egg plant seed oil (*Solanum melongena* (L), Solanaceae). *Revue Française des Corps Gras* (France), 1988.
- Codex stan 210, 1999. Codex Alimentarius, normes alimentaires internationales. Norme pour les huiles végétales portant amendement: 2005, 2011, 2013, 2015. Révision: 2001, 2003, 2009.
- CUVELIER, Christine, CABARAUX, Jean-François, DUFRASNE, Isabelle, *et al.* Acides gras: nomenclature et sources alimentaires. In : *Annales de Médecine Vétérinaire. Annales Médecine Vétérinaire*, 2004. p. 133-140.
- EMMERIE, A. et ENGEL, Chr. Colorimetric determination of tocopherol (vitamin E): II Adsorption experiments. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, 1939, vol. 58, no 4, p. 283-289.

F. A. O., FAO/WHO CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, et al. Report of the Ninteenth Session of the Codex Committee on Fats and Oils, London (United Kingdom), 1 October 2005,p461

FRÉNOT, Marlène et VIERLING, Elisabeth. Biochimie des aliments: diététique du sujet bien portant. Wolters Kluwer France, 2001.

FRÉNOT, Marlène et VIERLING, Elisabeth. Les lipides. In biochimie des aliments diététique du sujet bien portant 2 e édition doin éditeur cndp centre régional de documentation pédagogique d'aquitaine. 2001.p 71-102

FRYER, Percival J. et WESTON, Frank E. Technical handbook of oils, fats and waxes. University press, 1918.

GREENFIELD, Heather et SOUTHGATE, David AT. Données sur la composition des aliments: production, gestion et utilisation. Food & Agriculture Org., 2007., p 107-162.

GUIGNARD, J.-L. Abrégé de biochimie végétale. Ed. Masson, Paris, 1996.p160 .

HAWKE, J. C., RUMSBY, M. G., et LEECH, Rachel M. Lipid biosynthesis in green leaves of developing maize. *Plant physiology*, 1974, vol. 53, no 4, p. 555-561.

HOPKINS, William G. l'organisation des plantes et des cellules végétales. In Physiologie végétale . De Boeck Supérieur, 2003.p 1-10.

HUDSON, Bertram JF et WARWICK, Michael J. Lipid stabilisation in leaf protein concentrates from ryegrass. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1977, vol. 28, no 3, p. 259-264.

JACOTOT, Bernard et CAMPILLO, Bernard. Nutrition humaine. Elsevier Masson, 2003.

JOUHET, Juliette, MARÉCHAL, Eric, BALDAN, Barbara, *et al.* Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria. *J Cell Biol*, 2004, vol. 167, no 5, p. 863-874.

KARLESKIND, Alain. Manuel des corps gras. Tome I et II. Ed : Technique et Documentation Lavoisier, Paris.1992.

MEHDADI, Zoheir, BENAOUA, Zineddine, BELBRAOUE, Slimane, *et al.* Évolution saisonnière de la composition foliaire de *Stipa tenacissima* L. en lipides totaux et en acides gras. *Science et changements planétaires/Sécheresse*, 2006, vol. 17, no 4, p. 493-498.

MILCENT, René et CHAU, François. Chimie organique hétérocyclique( structures fondamentales) . Ed : EDP sciences, 2003. p 849 .

YOUSFI,Mohamed. Caracterisation des molecules lipidiques et phenoliques de pistachierde l'Atlas" *pestacia Atlantica*". 2005. Thèse de doctorat. univ-blida 1.

MOUSSARD, Christian.Lipides. In Biochimie structurale et métabolique. De Boeck Supérieur, 2004., p143-150.

NAUDET, M. et HAUTFENNE, Albert. Standardized Method for the Determination of Total Sterols in Oils and Fats. *Revue Francaise des Corps Gras*, 1986, vol. 33, no 4, p. 167.

NGO-DUY, Cam-Chi, DESTAILLATS, Frédéric, KESKITALO, Marjo, et al. Triacylglycerols of Apiaceae seed oils: Composition and regiodistribution of fatty acids. *European journal of lipid science and technology*, 2009, vol. 111, no 2, p. 164-169.

OLLE, M., 1996. Analyse des corps gras. *Technique de l'Ingénieur*, Vol 3325, p 1 -15.

ROUESSAC, Francis, ROUESSAC, Annick, et DANIEL CRUCHE.,D.Chromatographie en phase gazeuse. In *Analyse chimique*. Dunod, 1996. p 61-85.

SAYED-AHMAD, Bouchra, TALOU, Thierry, SAAD, Zeinab, et al. The Apiaceae: Ethnomedicinal family as source for industrial uses. *Industrial Crops and Products*, 2017, vol. 109, p. 661-671.

SEBEDIO, J.-L. et PERKINS, Edward George (ed.). *New trends in lipid and lipoprotein analyses*. The American Oil Chemists Society, 1995.

SHEPHERD, Tom et WYNNE GRIFFITHS, D. The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytologist*, 2006, vol. 171, no 3, p. 469-499.

TJELLSTRÖM, Henrik, STRAWSINE, Merissa, et OHLROGGE, John B. Tracking synthesis and turnover of triacylglycerol in leaves. *Journal of experimental botany*, 2015, vol. 66, no 5, p. 1453-1461.

TLILI, Nizar, MEJRI, Houda, LAJNEF, Houda Ben, *et al.* 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*, 2015, vol. 92, no 8, p. 1175-1181.

TRABELSI, Hajer, CHERIF, OlfA Aicha, SAKOUHI, Faouzi, *et al.* Total lipid content, fatty acids and 4-desmethylsterols accumulation in developing fruit of *Pistacia lentiscus* L. growing wild in Tunisia. *Food chemistry*, 2012, vol. 131, no 2, p. 434-440.

VOET, Donald et VOET, Judith G.Lipides et membranes. In *biochimie*. De Boeck Supérieur, 2005. p 382-457.

WROLSTAD, Ronald E., ACREE, Terry E., DECKER, Eric A., et al. . Lipides .In *Handbook of food analytical chemistry: pigments, colorants, flavors, texture, and bioactive food components*. John Wiley and Sons, Inc, 2005., p 419 -646.

YOUSFI, Mohamed, BOMBARDA, Isabelle, HAMIA, Chahrazed, et al. Fatty acid, triglyceride and tocopherol composition of Algerian Argan (*Argania spinosa*) fruit seed lipids. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 2009, vol. 2, no 3, p. 197.



## Chapitre III

### *Activité antioxydante*

## RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

### 1. Métabolites secondaires

#### 1.1. Généralités sur les métabolites secondaires

Les plantes possèdent des métabolites dits « secondaires » par opposition aux métabolites primaires qui sont les protéines, les glucides et les lipides. Ces composés diffèrent en fonction des espèces et, bien que leurs rôles soient encore mal connus, il est cependant clair qu'ils interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec son environnement . (Kutchan *et al.*, 2015).

Les métabolites secondaires ne sont pas produits sous toutes les conditions. Dans la plupart des cas, leurs fonctions et intérêts pour l'organisme ne sont pas encore connues. Certaines de ces substances sont produites, pour des raisons défensives, contre les prédateurs, d'autres comme des agents volatils attracteurs pour la même espèce ou une espèce différente, ou bien comme des agents colorés pour attirer ou avertir les autres espèces (Dewick, 2009).

Si leur rôle écologique reste encore à préciser, leur utilisation par l'homme dans de nombreuses préparations thérapeutiques est très largement répandue. La pharmacognosie est étymologiquement la connaissance (*gnosis*) des poisons (*pharmacon*) d'origine naturelle. Ces substances toxiques possèdent, parfois à faible dose, des propriétés médicamenteuses et peuvent être utilisées à des fins thérapeutiques ( Krief ,2003).

La diversité des espèces utilisées et des métabolites secondaires déjà isolés laisse présager de l'ampleur de ce qui reste à découvrir. On considère effectivement que, jusqu'à ce jour, moins de 10 % des espèces de végétaux supérieurs qui peuplent actuellement la planète ont été explorées pour leurs propriétés chimiques et biologiques. On peut classer les métabolites secondaires en plusieurs grands groupes : parmi ceux ci, les alcaloïdes, les terpenoïdes, et les composés phénoliques (Salim *et al.*, 2008).

Trois principales catégories de molécules sont regroupées sous ce terme de métabolites spécialisés : les terpenoïdes, les alcaloïdes et les composés phénoliques (Salim *et al.*, 2008).

## 1.2. Les composés phénoliques

L'expression de composés phénoliques est utilisée pour toute substance chimique possédant dans sa structure un noyau aromatique, portant un ou plusieurs groupements hydroxyles et qui ne contient aucun atome d'azote et qui dérive de la biogénèse d'acide shikimique et/ou d'acétate (Bloor, 2001 ; Hennebelle et *al.*, 2004).

Il s'agit d'une classe de métabolites secondaires synthétisés par les plantes lors des différents stades de leur développement. On les trouve, d'une manière générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruit (Crozier et *al.*, 2006 ).

D'après Macheix et *al* (2005), les composés phénoliques sont regroupées en nombreuses classes qui se différencient par :

- ✓ La complexité du squelette de base (allant d'un simple C<sub>6</sub> à des formes très polymérisées).
- ✓ Le degré de modifications de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation...).
- ✓ Les liaisons possibles de ces molécules de bases avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, autres métabolites secondaires pouvant être ou non des composés phénoliques...).

La plupart des grande classes de polyphénols sont végétaux énumérés dans le Tableau 8 , en fonction de nombre d'atome de carbone de squelette de base.

**Tableau 8:** Grandes classes de polyphénols chez les végétaux

Nombre d'atome de carbone	Squelette de base	Classe	Exemple
6	C6	Phénols simples	catéchole
7	C6-C1	Acides phénoliques	Acide gallique
8	C6-C2	Acétophénone	3-acétyl-6-méthoxybenzaldehyde
9	C6-C3	Acides hydroxycinnamiques	Acide caféique
		Coumarines	scopolétole
10	C6-C4	Naphtoquinones	Juglone
13	C6-C1-C6	Xanthones	Mangiférine
14	C6-C2-C6	Stilbènes	Resvératrol
15	C6-C3-C6	Flavonoides	Quercétol
		Isoflavonoides	Daidzeine
		Anthocyanes	Malvidine
N		Oligomères procyanidoliques tanins	

### 1.3. Terpénoïdes

Les terpénoïdes (ou terpènes) regroupent un ensemble de molécules très différentes tant d'un point de vue structurel que fonctionnel. Avec plus de 40 000 molécules connues, ils constituent probablement la classe la plus vaste et la plus diversifiée de composés organiques végétaux (Aharoni et al., 2005). Les terpénoïdes sont également connus sous le nom d'isoprénoïdes car leur dégradation thermique libère un gaz, l'isoprène. Les terpénoïdes sont répartis dans différentes classes selon le nombre d'atomes de carbone qu'ils contiennent : hémiterpénoïdes (C5), monoterpénoïdes (C10), sesquiterpénoïdes (C15), diterpénoïdes (C20) triterpénoïdes (C30), tetraterpénoïdes (C40) et polyterpénoïdes (>C40).

Chez les plantes, l'isopentényl diphosphate (IPP) est le précurseur de tous les terpènes produit par deux voies métaboliques aux localisations subcellulaires différentes : la voie du mévalonate (cytosolique) et la voie du MEP/DOXP (plastidique) (Vranová et al., 2013)

### 1.4. Alcaloïdes

Plusieurs définitions du terme alcaloïde ont pu être données depuis son apparition en 1819, où W. Meissner a défini les alcaloïdes comme étant des substances dérivées de plantes qui réagissent comme des alcalis. Au cours des années et des découvertes de nouveaux alcaloïdes, la définition a évolué. En 1896, I. Guareschi écrit que le terme alcaloïde est applicable à tous composés organiques basiques obtenus à partir du règne animal ou de plantes, ou préparé artificiellement. Au 20ème siècle, des tournures différentes sont utilisées, la plus récente étant celle de S. W. Pelletier en 1983 : un alcaloïde est un composé organique cyclique contenant un atome d'azote dans un degré d'oxydation négatif qui a une distribution limitée à certains organismes vivants. Dans son livre, M. Hesse définit les alcaloïdes comme étant des substances organiques d'origine naturelle contenant un ou plusieurs atomes d'azote avec un caractère basique de degré plus ou moins fort.

Malgré leur structure variée, les alcaloïdes proviennent d'un petit nombre de précurseurs simples. La plupart d'entre eux sont synthétisés à partir d'acides aminés tels que la tyrosine, le tryptophane, l'ornithine. On attribue généralement aux alcaloïdes un rôle de défense pour le végétal. La plupart d'entre eux ont un goût amer, si bien qu'ils sont caractérisés comme composés répulsifs vis-à-vis des animaux et insectes (Hartmann, 1991).

Certains alcaloïdes sont fortement toxiques. La nicotine, par exemple, est un poison violent pour les insectes et a été l'un des premiers insecticides utilisés par l'Homme. Beaucoup d'alcaloïdes possèdent des propriétés antibiotiques et sont actifs contre les infections microbiennes (Yang et *al.*, 2010 ; Hu et *al.*, 2014).

## **1.5. Stress oxydant**

### **1.5.2. Stress oxydatif**

Les espèces réactives d'oxygène sont produites au cours du métabolisme cellulaire et sont impliqués dans les réactions enzymatiques, le transport d'électrons mitochondrial, la transduction du signal, l'activation des facteurs de transcription nucléaires, l'expression des gènes et l'action antimicrobienne des neutrophiles et des macrophages (Baydar, 2004). Comme il existe aussi des sources exogènes de ces espèces, tels que l'exposition au rayonnement, le tabagisme, les polluants et les pesticides, les solvants organiques, les anesthésies. Certains de ces composés ainsi que quelques médicaments peuvent se transformer en produits intermédiaires de radicaux libres qui vont endommager les tissus cibles (Machlin et Bendich, 1987). Dans les circonstances normales, on dit que la balance antioxydants/ pro-oxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux libres, l'excès de ces radicaux est appelé stress oxydant (Favier, 2003).

La perturbation de l'équilibre endogène entre radicaux libres et antioxydants de courte ou longue durée, provoque des effets délétères dus, soit à une défense antioxydante défaillante, soit à un état pro-oxydatif accru, nommé stress oxydant (Biesalski et *al.*, 97).

### **1.5.3. Conséquences moléculaires du stress oxydatif**

Le stress oxydatif est impliqué dans de très nombreuses pathologies comme facteur déclenchant ou associé à des complications (Favier, 2003). Il peut être associé à l'athérosclérose, l'asthme, l'arthrite, la cataractogénèse, l'hyperoxie, l'hépatite, l'attaque cardiaque, les vasospasmes, les traumatismes, les accidents vasculaires cérébraux, les pigments d'âge, les dermatites, les dommages de la rétine, les parodontites et les cancers (SAKIHAMA et al., 2002). Néanmoins, la plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale des radicaux (Favier, 2003)

### **A. Oxydation de l'ADN**

Le dommage oxydatif aux acides nucléiques inclue l'addition des bases et des groupes de sucres, cassures au niveau de la simple et double hélice ainsi que la formation des liaisons croisées avec d'autres molécules (Beckman et Ames, 1998).

### **B. Oxydation des glucides**

Le glucose peut s'oxyder en présence des ions métalliques conduisant à la libération des cétoaldéhydes,  $H_2O_2$  et OH. qui peuvent entraîner la coupure des protéines ou leur glycation par attachement du cétoaldéhyde. Ce phénomène de glycosoxydation est très important chez les diabétiques et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine (Favier, 2003)

### **C. Oxydation des protéines**

Les structures (primaire, secondaire et tertiaire) et les fonctions des protéines sont aussi altérées par les ERO. Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées et inactivées.

L'oxydation protéique catalysée par les ions métalliques conduit à l'addition de groupes carbonyles, la formation des liaisons croisées et la fragmentation des chaînes peptidiques. (Ahsan et al., 2003). Le dommage oxydatif des protéines peut affecter la fonction des récepteurs, des enzymes et des protéines de transport, et peut même générer de nouveaux antigènes qui provoquent des réponses immunitaires (PHD, Okezie, 1999; Favier, 2003).

### **D. Oxydation des lipides**

Les acides gras polyinsaturés (AGPI), un des principaux constituants lipidiques des membranes cellulaires et des lipoprotéines, sont la cible privilégiée des EOR. Leurs produits d'oxydation peuvent participer en tant que second messager à la régulation de fonctions métaboliques, de l'expression des gènes et de la prolifération cellulaire. Ils peuvent aussi, et surtout, se comporter comme des substances toxiques responsables des dysfonctionnements et d'altérations cellulaires (perte d'acides gras polyinsaturés, diminution de la fluidité membranaire, modification de l'activité des enzymes et des récepteurs membranaires) (Beckman et Ames, 1998 ; Lehucher-Michel, 2001)

#### **1.5.4. Antioxydants**

Les antioxydants sont des composés très divers qui regroupent des protéines à activité enzymatique (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase) et non enzymatique (séquestrant des métaux) et des petites molécules liposolubles (vitamine E,  $\beta$ -carotène) ou hydrosolubles (vitamine C, acide urique). Une définition large du terme antioxydant donnée par B. Halliwell est « toute substance qui, présente à faible concentration comparée à celle du substrat oxydable, retarde ou prévient de manière significative l'oxydation de ce substrat » (Cillard et al., 2006)

Ce sont des molécules d'origine naturelle ou le plus souvent synthétique, pourvues d'un ou plusieurs radicaux hydroxyles qui leur confèrent un pouvoir réducteur et les rendent capables d'interrompre la réaction en chaîne conduisant à la formation des hydroperoxydes ou bien des peroxydes (Revuz. 2006).

#### **1.5.5. Principaux antioxydants**

L'antioxydant alimentaire idéal est facilement incorporable, efficace à faible dose, non toxique, n'entraîne ni coloration, ni odeur, ni saveur indésirable, résistant aux processus technologiques, et stable dans le produit fini.

Un bon antioxydant doit respecter quelques critères (Valko et al., 2004) :

- ✓ Capable de piéger directement et spécifiquement les radicaux libres.
- ✓ Chélater des ions de métaux de transition ( $Fe^{2+}$ ,  $Cu^+$ ).
- ✓ Interagir avec d'autres antioxydants.
- ✓ Avoir un effet positif sur l'expression génique.
- ✓ Être rapidement absorbé .
- ✓ Avoir une concentration qualifiée de « physiologique » dans les tissus et les fluides biologiques.
- ✓ Être efficace en milieu aqueux et/ou dans le milieu membranaire.

#### **A. Antioxydants naturels**

La plupart des substances alimentaires issues de plantes qui contiennent des inhibiteurs naturels de l'oxydation. Les plus connues parmi celles-ci on trouve : Les protéines, les acides aminés, phospholipides, caroténoïdes, tocophérols, composés phénoliques, acides polycarboxyliques, acide ascorbique, huiles essentiels (Graille, 2003).



## B. Antioxydants synthétiques

Les antioxydants naturels ne sont pas toujours suffisants pour stabiliser les lipides et les denrées alimentaires, dans tel cas une addition d'antioxydants synthétiques est possible, les plus répandus sont : Dibutyldihydroxytoluène (BHT), Butyldihydroxyanisole (BHA), Acide nordihydrogalarétique (NDGA), éthylène diamine tetracétique acide (EDTA) (Revuz, 2006).

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. Extraction des métabolites par un fractionnement solide-liquide

Les techniques classiques d'extraction de composés chimiques végétales présentent souvent des contraintes telles que le faible rendement, le temps d'extraction très long et l'utilisation de grandes quantités de solvants. De nombreuses techniques alternatives ayant pour but de pallier à ces problèmes se sont développées. Parmi elles émergent les micro-ondes, les fluides supercritiques et les ultrasons.

L'extraction par ultrason est une technique fréquemment utilisée pour l'extraction des composés bioactifs à partir des matières végétales. Les ultrasons de puissance sont maintenant bien connus pour avoir des effets significatifs sur la cinétique de certaines réactions chimiques ou encore sur la réduction du temps des procédés industriels. En effet la cavitation induite par les ultrasons dans les milieux liquides se traduit entre autres par des accélérations de cinétique et/ou des améliorations du rendement, notamment dans le cas de l'extraction solide-liquide ( Shen Jinchao et Xueguang, 2005 ; Arceusz et al., 2013)

Au cours de cette étude, et afin de solubiliser un maximum de composés, trois solvants de polarités différentes ( dichlorométhane , acétate d'éthyle et méthanol) sont employés. L'extraction était réalisée par sonication, en macérant 20g d'échantillon délipidé dans 100 ml de solvant pendant une heure et à la température de 35 C° .

Avant l'utilisation d'un nouveau solvant, le matériel végétal doit être séché du solvant précédent. Après la filtration les trois extraits organiques ont été concentrés sous vide aux températures de 45 C°. Après la concentration, ces extraits ont été séchés à l'air libre. on a obtenu pour chaque partie de plante trois extraits bruts : graines immatures (DCM Gim, Ac-O-Et Gim, MeOH Gim ), graines matures (DCM Gm, Ac-O-Et Gm , MeOH Gm ),

feuilles (DCM F, Ac-O-Et F, MeOH F), racines (DCMR, Ac-O-Et R, MeOH R). Les étapes suivies sont schématisées dans la Figure 21.

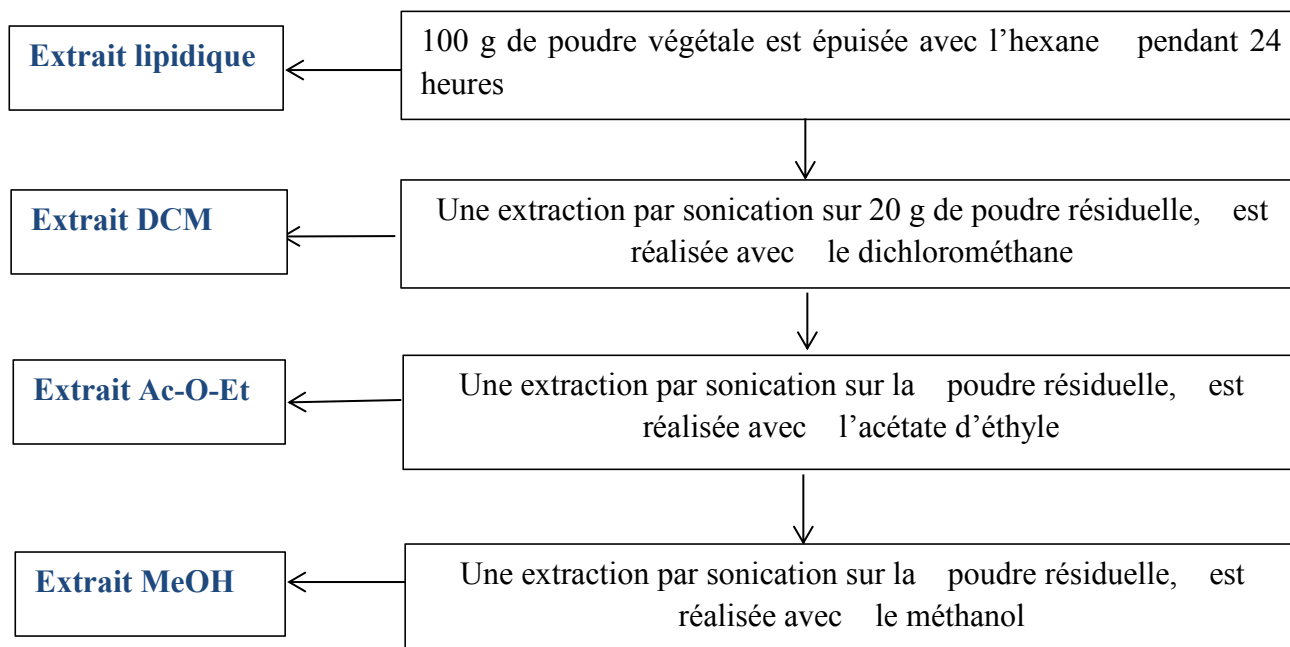


Figure 21: Procédure d'extraction par fractionnement solide-liquide

## 2. Dosages et quantification de quelques métabolites secondaires

### 2.1. Dosage des phénols totaux

#### a) Principe

Le principe de ce dosage est adapté par Singleton et Ross (en 1965) avec le réactif de Folin -Ciocalteu (Giner-Chavez, 1997). Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune, constitué de polyhétérocycles acides contenant l'acide phosphotungstique  $H_3PMo_{12}O_{40}$  et l'acide phosphomolybdique  $H_3PW_{12}O_{40}$  qui sont réduits lors de l'oxydation des phénols en oxydes bleus de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ) formant un complexe stable bleu qui absorbe fortement à une longueur d'onde de l'ordre de 760 nm. Le phénol standard utilisé pour établir la courbe d'étalonnage est l'acide gallique.

### **b) Protocole**

Pour établir la courbe d'étalonnage de l'acide gallique, une gamme des solutions diluées d'acide gallique a été préparée à partir d'une solution étalon. Deux cents cinquante microlitres de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué 10 fois) ont été ajoutés à 50 µl de chaque solution diluée de l'acide gallique ou de l'extrait végétal dilué, après 2 minutes, 1 ml de carbonate de sodium Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 4% (m/v) ont été ajoutés, ces solutions ont été maintenues à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. La lecture de l'absorbance de chaque solution est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre de Shimadzu 1601 à une longueur d'onde de 760 nm contre un blanc (ce qui nous a permis de tracer la courbe d'étalonnage de l'acide gallique et de doser les phénols totaux dans les extraits végétaux).

## **2.2. Dosage des flavones et flavonols**

### **a) Principe**

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode adaptée par Lamaison et Carnat (1991) en utilisant le trichlorure d'aluminium comme réactif (Quettier-Deleu, 2000). Le trichlorure d'aluminium forme un complexe acide stable avec le groupement carbonyle C-4 et aussi les groupements hydroxyles C-3 et C-5 des flavones et flavonols, en plus il forme des complexes acides labiles avec les groupements dihydroxyles en ortho du cycle A ou B des flavonoïdes (Mabry et al., 1970), ce complexe est de coloration jaune absorbe fortement à une longueur d'onde de 430 nm. Le flavonol standard utilisé pour établir la courbe d'étalonnage est la quercétine.

### **b) Protocole**

A partir d'une solution méthanolique de la quercétine, une gamme des solutions diluées a été préparée en milieu aqueux pour établir la courbe d'étalonnage.

Cinq cents µl de chaque solution diluée ou de l'extrait végétal dilué est mélangé avec 0,5 ml du trichlorure d'aluminium 2 % (m/v), ces solutions ont été maintenues à l'obscurité pendant 15 minutes à température ambiante. La lecture de l'absorbance de chaque solution a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre de Shimadzu 1601 à une longueur d'onde de 430 nm contre un blanc (ce qui nous permet de tracer la courbe d'étalonnage de la quercétine et de doser les flavones et les flavonols dans nos extraits).

### 3. Étude de l'activité antioxydante des extraits

#### 3.1. Test de DPPH

##### a. Principe

De nombreuses méthodes sont utilisées actuellement pour évaluer cette activité. Le radical DPPH a été largement utilisé pour l'étude de l'activité antiradicalaire des différents extraits végétaux. Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques (Brand-Williams et *al.*, 1995).

Le DPPH ou bien 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl est un radical libre stable, à température ordinaire il présente une couleur violette caractéristique. Les antioxydants présents dans l'échantillon le réduisent (Figure 26), ce qui entraîne une décoloration facilement mesurable par spectrophotométrie à 514–518 nm. Plus la diminution de l'absorbance du DPPH est importante plus le pouvoir antioxydant des extraits est élevé (Molyneux, 2004).

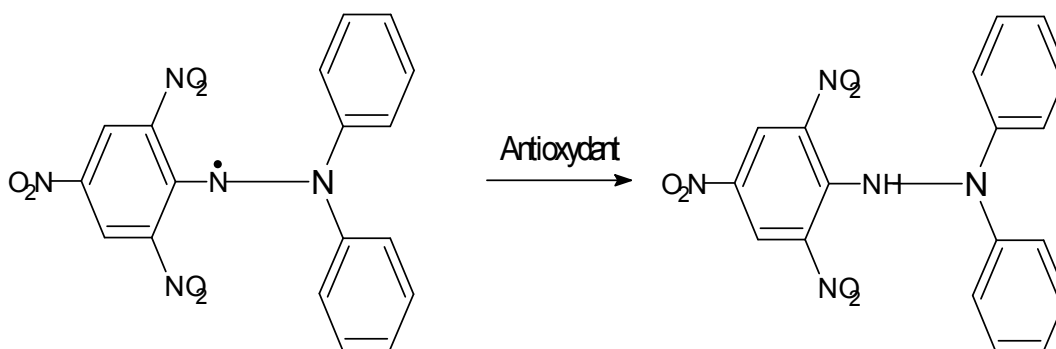


Figure 22: Réduction du radical libre DPPH

##### b. Protocole expérimental

Une quantité de 0,5 ml d'une solution méthanolique de DPPH<sup>•</sup> de concentration 100 μM a été ajoutée à 0,5 ml d'extrait phénolique de concentrations croissantes. Après une incubation de 30 minutes, nous avons effectué la lecture à l'aide du spectrophotomètre Shimadzu 1601 à 517 nm.

Nous avons calculé le pourcentage d'inhibition I % suivant l'équation :

$$I (\%) = [1 - (A / A_0)] 100$$

Sachant que:

**I (%)** : le pourcentage d'inhibition en %.

**A**: absorbance de la solution de DPPH en présence de l'extrait.

**A<sub>0</sub>**: absorbance de la solution de DPPH en absence de l'extrait.

### 3.2. Test de FRAP

#### a. Principe

Ce test est basé sur la réduction du complexe Fe<sup>3+</sup>-TPTZ (tripirydyltriazine) en sa forme ferreuse (Fe<sup>2+</sup>-TPTZ) par un agent réducteur à un pH acide . Ceci engendre l'apparition d'une couleur bleue avec une absorbance maximale à  $\lambda = 593\text{nm}$ . (Benzie et Strain, 1996)

#### b. Protocole expérimental

Le milieu réactionnel est constitué de 100 $\mu\text{l}$  de la dilution des extraits dans le méthanol et 1 ml du réactif FRAP. Ce dernier est préparé comme suit : 10ml d'une solution tampon d'acétate de sodium (pH = 3,6) et mélangé avec 1 ml d'une solution de TPTZ (10mM ) préparée dans une solution HCl 40mM, et 1 ml d'une solution FeCl<sub>3</sub> (20mM). Le mélange réactionnel est ensuite incubé pendant 7min, et les absorbances ont été déterminées contre un blanc à une longueur d'onde  $\lambda = 593\text{nm}$ .

Le pourcentage d'inhibition I % est calculé suivant l'équation :

$$I (\%) = [(A_e)/A_f] \times 100$$

Sachant que **I (%)** : le pourcentage d'inhibition en %.

**A<sub>e</sub>**: absorbance de l'extrait.

**A<sub>f</sub>** : l'absorption correspond à 100% de réduction des ions ferriques dans 1 ml de réactif FRAP.

#### 4. Analyse statistique

Les résultats ont été exprimés par la moyenne et son écart type, toutes les expériences ont été reproduites trois fois. L'analyse des résultats a été effectuée à l'aide de Office Writer et SPSS

### RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

#### 1. Rendement d'extraction

A notre connaissance, il n'existe pas de travaux publiés sur l'étude de l'activité antioxydante des différentes parties de *Thapsia garganica*, et faute d'informations suffisantes sur sa composition chimique, nous n'avons pu prédire la meilleure méthode d'extraction des métabolites secondaires qui repose sur plusieurs paramètres tels que le type de solvant, la durée et la température d'extraction et la composition chimique de la partie à étudier.

Dans ce travail, nous avons effectué des extractions successives pour chaque partie de plante en utilisant des solvants aux polarités croissantes. Cette technique permet d'extraire le maximum de composés chimiques présents, le Tableau 9 contient le contenu ainsi que l'aspect et la couleur des extraits secs obtenus.

**Tableau 9:** Teneurs en extraits bruts (m/m %)

<b>Organe</b>	<b>Solvant d'extraction</b>	<b>La teneur (%)</b>
<b>feuilles</b>	Dichlorométhane	0,69
	Acétate d'éthyle	0,18
	Méthanol	10,08
<b>Racines</b>	Dichlorométhane	0,74
	Acétate d'éthyle	0,21
	Méthanol	4,27
<b>Graines immatures</b>	Dichlorométhane	1,98
	Acétate d'éthyle	0,32
	Méthanol	16,34
<b>Graines matures</b>	Dichlorométhane	2,24
	Acétate d'éthyle	0,69
	Méthanol	5,40

En général, les rendements d'extraction obtenus par les solvants utilisés varient de 0,18% à 16,34%, l'analyse des résultats du Tableau 9 par le test ANOVA montre une différence significative entre les rendements obtenus par les différents solvants ( $p=0,009$ ) avec une forte différence entre les rendements de chaque solvant pour les différentes parties étudiées.

Il ressort de l'observation des rendements d'extraction de la Figure 23 que le classement des teneurs en extrait brut des différents solvants était la même pour les quatre parties de la plante, de sorte que le meilleur rendement est enregistré pour le méthanol dont les teneurs varient de 0,25% pour les racines à 16,34 pour les graines immatures, suivi du dichlorométhane, avec lequel les graines immatures et matures ont donné le meilleur rendement, l'acétate d'éthyle ayant le moins bon rendement.

La différence remarquable entre les rendements de l'extraction obtenues dans cette étude est due à la plante elle-même (la partie de la plante utilisée, la période de récolte de chaque partie, les conditions extérieures), et le solvant d'extraction, ainsi le dichlorométhane est un solvant avec une polarité de 2,8, donc il a un pouvoir important dans l'extraction des composés modérément polaires, notamment les flavonoïdes aglycones (Soczewinski et *al.*, 2004).

L'acétate d'éthyle est un solvant connu pour sa meilleure capacité à extraire les composés phénoliques, les flavonoïdes et les lactones sesquiterpéniques (Balboul et al., 1997), ces deux solvants ont des polarités similaires et peuvent extraire les mêmes structures, c'est pourquoi nous avons obtenu un faible rendement par l'acétate d'éthyle. Le rendement élevé obtenu par le méthanol montre la richesse de *Thapsia garganica* en métabolites polaires.

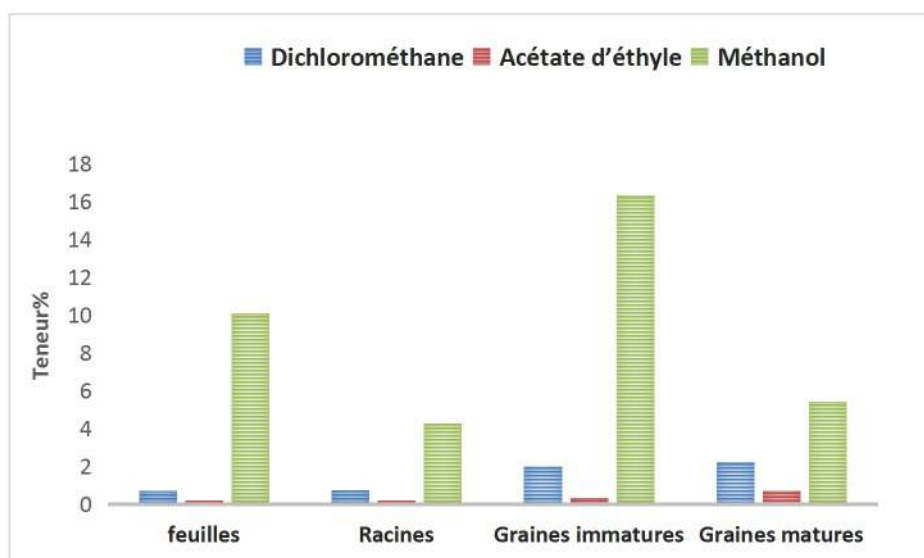


Figure 23: Teneurs en résidus secs obtenus par les différents solvants

## 2. Dosages et quantification des phénols totaux et des flavonoïdes

La teneur en phénols et en flavonoïdes de chaque extrait végétal a été calculée à partir des courbes d'étalonnage (Figures 24 et 25) et est exprimée en milligrammes équivalent acide gallique et en milligrammes équivalent quercitrine par gramme de matière végétale sèche ou par gramme d'extrait sec, respectivement, et les résultats de ce dosage colorimétrique sont indiqués dans les Tableaux 10 et 11.



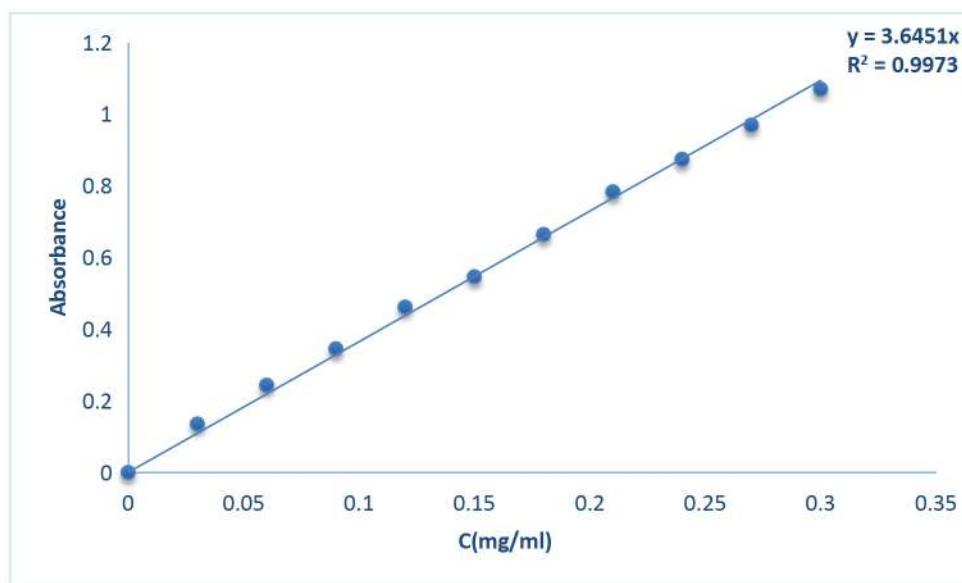


Figure 24: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

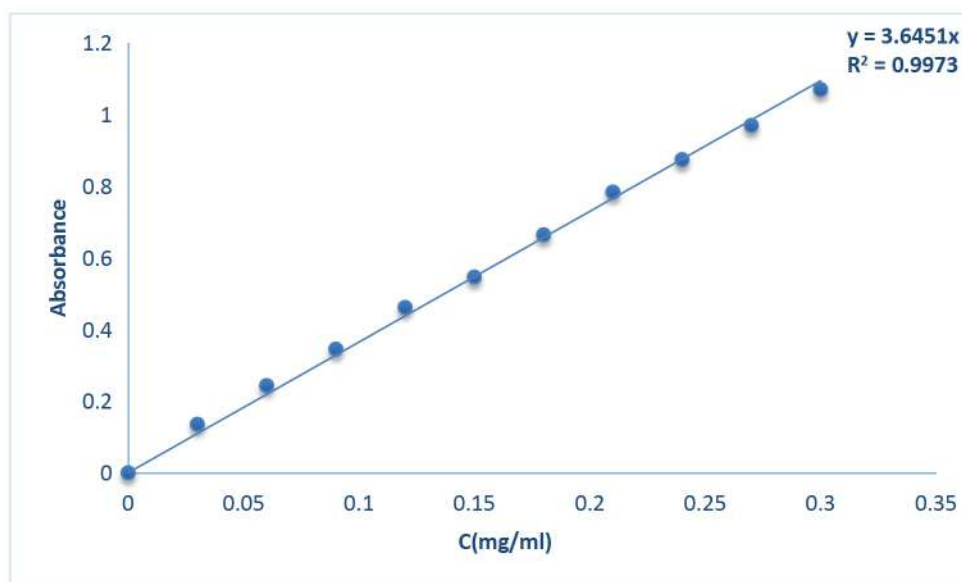


Figure 25: Courbe d'étalonnage de la quercétine

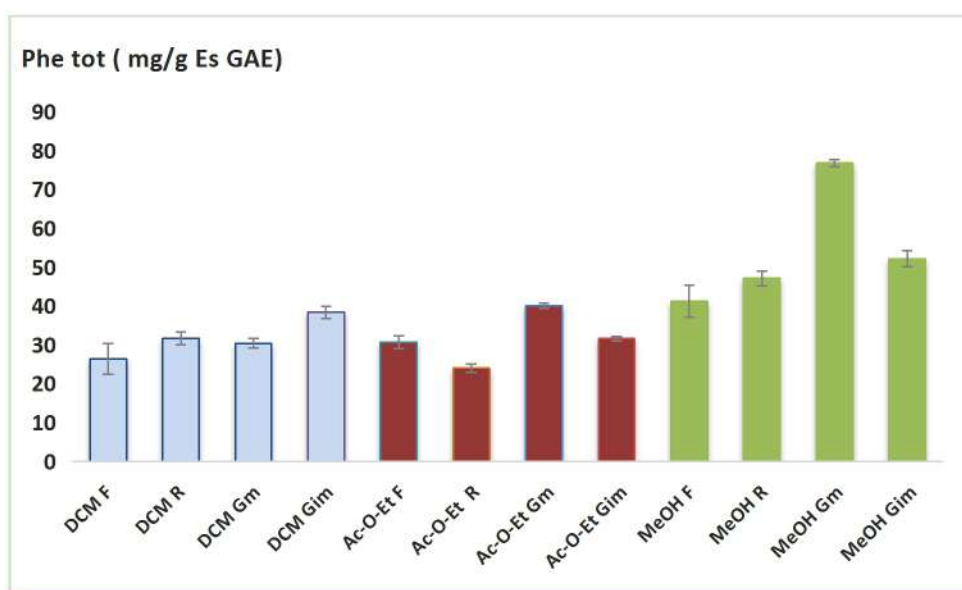
**Tableau 10:** Teneurs en phénols totaux mg EAG/g (MS, Es )

Organe	Dichlorométhane		Acétate d'éthyle		Méthanol	
	( mg/g Ms)	( mg/g Es)	( mg/g Ms)	( mg/g Es)	( mg/g Ms)	( mg/g Es)
<b>Feuilles</b>	0,18±0,02	26,46±4,00	0,06±0,00	30,76±1,7	4,16±0,10	41,28±1,42
<b>Racines</b>	0,24±0,00	31,73±1,7	0,05±0,00	24,06±1,07	2,05±0,05	47,19±1,8
<b>Graines m</b>	0,68±0,02	30,45±1,23	0,28±0,00	40,12±0,67	4,15±0,03	76,86±0,92
<b>Graines im</b>	0,76±0,02	38,45±1,56	0,100±0,00	31,65±0,57	8,53±0,23	52,23±2,05

**Tableau 11:** Teneurs en flavonoïdes mg EQ /g (MS, Es )

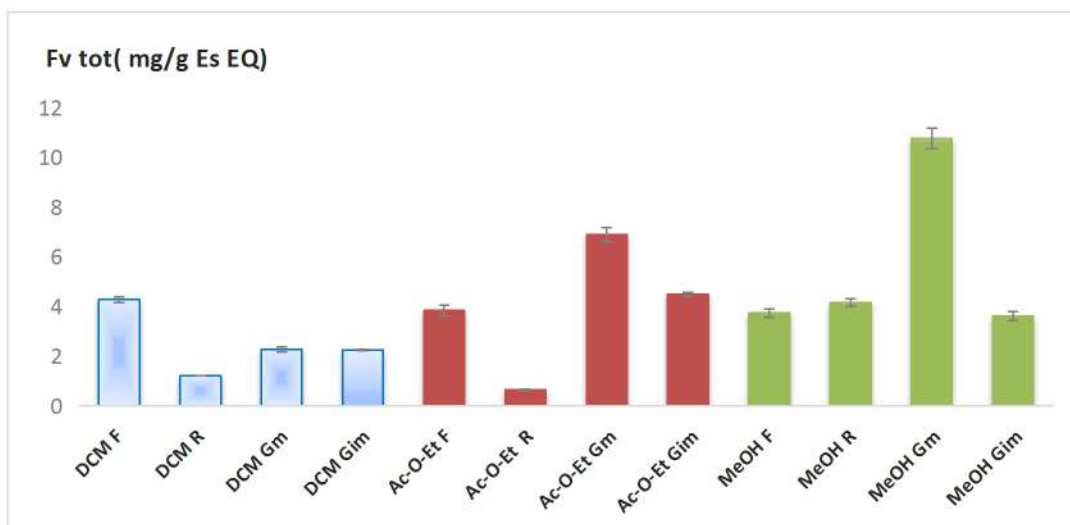
Organe	Dichlorométhane		Acétate d'éthyle		Méthanol	
	( mg/g Ms)	( mg/g Es)	( mg/g Ms)	( mg/g Es)	( mg/g Ms)	( mg/g Es)
<b>Feuilles</b>	0,029±0,0	4,28±0,11	0,007±0,00	3,83±0,21	0,38±0,03	3,73±0,32
<b>Racines</b>	0,008±0,0	1,21±0,00	0,001±0,00	0,64±0,02	0,18 ±0,00	4,15±0,11
<b>Graines m</b>	0,05±0,0	2,27±0,09	0,048±0,00	6,89±0,28	0,58±0,016	10,76±0,4
<b>Graines im</b>	0,045±0,0	2,25±1,26	0,014±0,00	4,48±0,08	0,59±0,02	3,61±0,18

Les teneurs polyphénols totaux obtenues par les trois solvants sont exprimées en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait sec et varient de 24,06 à 76,86 mg EAG/g Es. L'analyse de variance (ANOVA) pour comparer les teneurs obtenues par les trois solvants (Figure30) révèle une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre les solvants utilisés. Toutefois, le méthanol donne le meilleur rendement en polyphénols avec une concentration de  $54,39 \pm 15,63$  (mg EAG/g Es) en moyenne mais avec un écart type élevé entre les différentes parties de la plante, les rendements obtenus par le dichlorométhane et l'acétate d'éthyle sont très similaires ( $p > 0,05$ ), soit en moyenne  $31,77 \pm 4,99$  et  $31,67 \pm 6,59$  (mg EAG/g Es) respectivement.



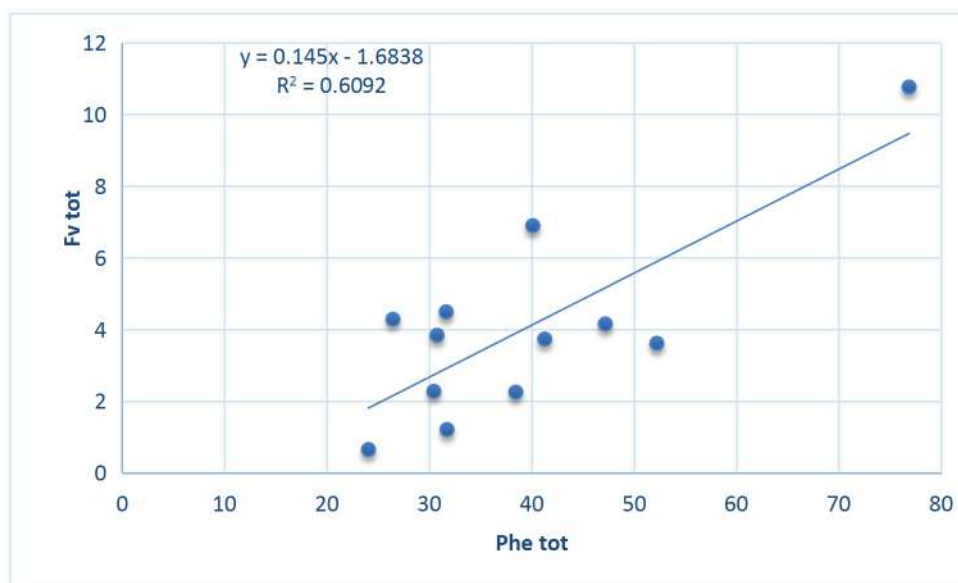
**Figure 26:** Histogramme représentant les teneurs en polyphénols dans les différents extraits

Pour les flavonoïdes, les teneurs étaient de  $0,64 \pm 0,02$  (mg EQ/g Es) pour l'extrait d'acétate d'éthyle de racines et de  $10,76 \pm 0,4$  (mg EQ /g Es) pour l'extrait méthanolique de graines (Figure 27). L'analyse de variance (ANOVA) des résultats obtenus ne montre pas de différence significative entre les moyennes des teneurs obtenues par les trois solvants, à savoir  $2,5 \pm 1,29$  pour le dichlorométhane,  $3,97 \pm 2,57$  pour l'acétate d'éthyle et  $5,56 \pm 3,47$  pour le méthanol mais avec une différence remarquable entre les différentes parties de la plante (écarts types élevés).



**Figure 27:** Histogramme représentant les pourcentages des flavonoïdes dans les différents extraits

Une forte corrélation est enregistrée entre les taux de phénols totaux et de flavonoïdes des différents extraits (Figure 28). Et ceci avec un coefficient de Pearson de 0,780 \*\* qui indique que les teneurs en flavonoïdes et en polyphénols sont étroitement liées.



**Figure 28:** Régression linéaire entre les taux de phénols et de flavonoïdes totaux

La solubilité des polyphénols dépend principalement du nombre de groupes hydroxyle, du poids moléculaire et de la longueur de la chaîne carbonée du squelette de base (Mohammedi et *al.*, 2011). Les résultats obtenus dans le cadre de nos travaux confirment les conclusions du paravent qui confirme que le rendement en polyphénols augmente avec la polarité du solvant de l'extraction et préfère, pour améliorer cette dernière, l'utilisation des alcools et notamment du méthanol et de l'éthanol (Sripad et al., 1982 ; Ignat et *al.*, 2011).

Il est à noter que le pouvoir extractif des trois solvants ne peut être jugé tant qu'ils sont utilisés successivement et non séparément, mais on peut avoir une idée de la composition des extraits en fonction de la polarité des solvants utilisés, ainsi le dichlorométhane et l'acétate d'éthyle avec une polarité moyenne ont un pouvoir extracteur significatif des molécules à polarité moyenne comme les flavonoïdes aglycones (Soczewinski et *al.*, 2004; Scholz et Rimpler, 1989). Le méthanol, qui est le solvant le plus polaire du système utilisé, permet d'obtenir des structures plus polaires.

Pour avoir une idée de la variation de la teneur en polyphénols et flavonoïdes totaux selon la partie de la plante, nous avons calculé leurs concentrations en mg EAG/g Ms et mg EQ /g Ms respectivement. ( Tableaux 10 et 11 ) et les résultats obtenus montrent que les extraits de méthanol ont des concentrations très élevées par rapport au dichlorométhane et acétate d'éthyle, cela indique la richesse des différentes parties du *Thapsia garganica* en composés polaires .

La somme des trois rendements obtenus par le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le méthanol donne la concentration en polyphénols pour chaque organe (Tableau 12). Les teneurs en composés phénoliques de nos extraits sont inférieures à celles obtenues par Neffati pour l'extrait éthanolique de la partie aérienne de *Thapsia garganica* d'origine tunisienne (156,5 mg EAG/g Ms), mais selon la même étude, les valeurs obtenues pour les graines et feuilles sont proches de celles de l'extrait aqueux de *Thapsia garganica* (10,75 mg EAG/g Ms) (Neffati et al., 2017).

Djridane et al.,2006 ont obtenu une teneur en composés phénoliques de  $7,63\pm 0,61$  mg EAG/g Ms, pour la partie aérienne de *Thapsia garganica* . Sachant qu'ils ont récolté la plante en juin dans la ville de Laghouat, et ayant utilisé 70% d'éthanol comme solvant d'extraction. Ce résultat est inférieur à celui obtenu dans notre étude.

Les différences observées pour le contenu en polyphénols d'une même espèce peuvent être liées aux différences de climat, de type de sol, de situation géographique, de saison de récolte et des méthodes d'extraction utilisées.

Les teneurs en composés phénoliques des extraits de graines de *Thapsia garganica* matures et immatures, obtenues par le système solvant utilisé, sont supérieures à celles de plusieurs autres graines de la même famille tels que les extraits éthanoliques de cumin, coriandre et de ajwain (Saleem et al., 2017).

Une des caractéristiques des polyphénols qu'ils partagent avec les métabolites secondaires est qu'ils sont très inégalement répartis au niveau cellulaire ou tissulaire d'une plante, il existe même des polyphénols qui ne s'accumulent que dans des organes bien définis (Macheix et al., 2005).

La différence entre les teneurs totales en polyphénols des différents organes de *Thapsia garganica* est très importante ( $p < 0,01$ ), les graines immatures donnant les teneurs les plus élevées ( $9,39\pm 0,25$ ). Cette teneur est environ deux fois plus élevée que celle enregistrée

pour les feuilles ( $4,4 \pm 0,12$ ) et quatre fois plus élevée que celle enregistrée pour les racines ( $2,34 \pm 0,05$ ). Ces dernières semblent être les plus pauvres en polyphénols alors que les graines matures ont une valeur moyenne de  $5,11 \pm 0,05$ .

En ce qui concerne la teneur en flavonoïdes, les valeurs trouvées pour les feuilles, les racines, les graines matures et les gaines immatures, sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ). Les graines matures et immatures sont les plus riches en flavonoïdes et ont atteint des valeurs proches de  $0,68 \pm 0,016$  et  $0,65 \pm 0,02$  (mg EQ/g Ms), suivies des feuilles avec  $0,42 \pm 0,03$  (mg EQ/g Ms) et des racines avec la teneur la plus basse par rapport aux autres organes avec une concentration de  $0,42 \pm 0,03$  (mg EQ/g Ms).

Les composés phénoliques sont produits au cours du processus de réponse contre les agents pathogènes et ils sont naturellement sous forme conjuguée (esters ou glycosides) et non libres. Par conséquent, les graines, qui contiennent généralement plus de glucose, sont plus riches en composés phénoliques (Li Zhiling et *al.*, 2017). Dans cette étude, les graines (matures et immatures), qui ont généralement plus de réserves, ont des concentrations de polyphénols et de flavonoïdes plus élevées que les feuilles et les racines.

La richesse en polyphénols et flavonoïdes de la partie aérienne (graines et feuilles) par rapport à la partie souterraine (racines) pourrait s'expliquer par le fait qu'elle est plus exposée au soleil. En effet, les flavonoïdes protègent les tissus de la plante des effets nocifs du rayonnement solaire (Gehin et *al.*, 2006).

En calculant les pourcentages en flavonoïdes par rapport aux phénols totaux pour les différentes parties de *Thapsia garganica* nous avons constaté une différence considérable entre les proportions des flavonoïdes dans les phénols totaux entre les différentes parties de plante, et spécialement entre les graines matures et immatures, ce qui indique la variation de la composition en polyphénols pendant la maturation.

**Tableau 12** : Teneurs en polyphénols et flavonoïdes dans les différentes parties de *Thapsia garganica* mg EQ /g MS

	<b>Phe Tot ( mg/g Ms)</b>	<b>Fv Tot ( mg/g Ms)</b>	<b>Rapport: Fv/Phe</b>
<b>Feuilles</b>	4,40±0,12	0,42 ±0,03	9,55
<b>Racines</b>	2,34±0,05	0,19 ±0,00	8,11
<b>Graines m</b>	5,11±0,05	0,68±0,016	13,31
<b>Graines im</b>	9,39±0,25	0,65±0.02	6,92

### 3. L'activité antioxydante des différents extraits

#### 3.1. Test DPPH

Le paramètre  $IC_{50}$  " efficient concentration " (également appelé valeur  $EC_{50}$ ) qui est défini comme la concentration effective du substrat, provoque la perte de 50% de l'activité DPPH. La valeur d' $IC_{50}$  de chaque extrait est déduite graphiquement des courbes de variation du pourcentage d'inhibition I% (Annexe 1) en fonction de la concentration de chaque extrait. L' $IC_{50}$  et l'activité antioxydante de l'extrait testé sont inversement proportionnelles. Les valeurs du  $IC_{50}$  trouvées pour tous les extraits testés ainsi que les valeurs du  $IC_{50}$  de certains antioxydants de référence sont présentées dans le Tableau13.

Les valeurs  $IC_{50}$  des différents extraits varient de (0,05±0,00 mg/ml) pour les extraits de méthanol provenant de feuilles et de graines immatures et (2,93±0,03 mg/ml) pour les extraits de dichlorométhane des feuilles. Les extraits d'acétate éthyle et méthanoliques des graines matures, graines immatures et ceux des feuilles ont des activités anti-radicalaires similaires et sont généralement plus actifs que les extraits de racines, alors pour les extraits dichlorométhane ce sont les graines qui ont donnés les meilleures activités.

**Tableau 13:** Les valeurs IC<sub>50</sub> de test DPPH pour les différents extraits de *Thapsia garganica*

	Insaponifiables	Hexane	Dichlorométhane	Acétate d'éthyle	Méthanol
<b>Feuilles</b>	0,68±0,01	1,33±0,02	2,93±0,03	0,31±0,000	0,05±0,000
<b>Racines</b>	0,94±0,03	1,14±0,02	1,37±0,03	0,74±0,01	0,3±0,009
<b>Graine m</b>	1,14± 0,04	32,96 ±1.78	0,51±0,003	0,39±0,015	0,06±0,000
<b>Graine im</b>	4,16±0,05	28,58± 0,15	0,48±0,006	0,38±0,002	0,05±0,000
<b>Les standards</b>					
<b>Vitamine E</b>	0,021±0,0004				
<b>Vitamine C</b>	0,0075±0,000				

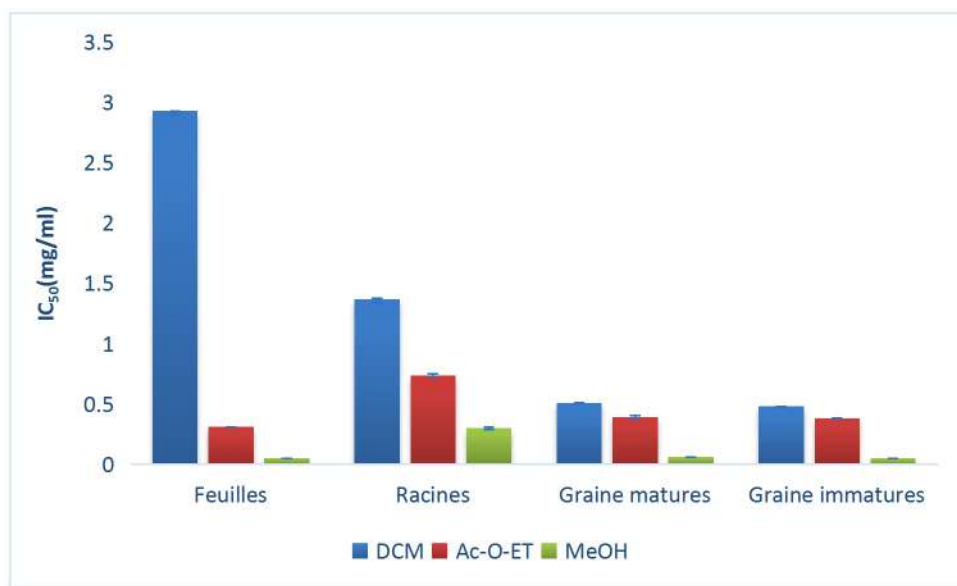
Selon les résultats présentés dans l'histogramme de la Figure 29, les activités anti-radicalaire des différents extraits de *Thapsia garganica* sont classés dans cet ordre croissant ; dichlorométhane, éthyle acétate et méthanol, ce résultat confirme celui obtenu par Kang et *al.*, qui suggèrent que les molécules polaires présentes dans les extraits végétaux contribuent à la montée en activité antiradicalaire.

Si nous comparons l'activité antioxydante de nos extraits avec celles obtenues avec les standards (vitamines C et E), nous pouvons conclure que les différentes parties de *Thapsia garganica* ont des activités importantes, notamment les extraits méthanoliques des feuilles et graines qui sont presque sept fois moins actifs que la vitamine C et deux fois moins actifs que la vitamine E.

Les valeurs des IC<sub>50</sub> des différents extraits étudiés dans ce travail sont supérieures à celles des extraits éthanoliques (0,024 mg/ml) et aqueux (0,02mg/ml) de la partie aérienne de *Thapsia garganica* étudiés par Naffati et *al.* Les extraits méthanoliques de graines et feuilles ont des valeurs du IC<sub>50</sub> proches de celles des extraits méthanoliques de graines de *Thapsia garganica* étudiés par TLILI Nizar et *al.* (2015) avec une valeur de 0,046 ± 0,0 mg/ml



Comparons 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 IC<sub>50</sub> de 0,687 ± 0,028mg/ml et 1,930 ± 0,024 mg/ml respectivement (Martin ,2016).



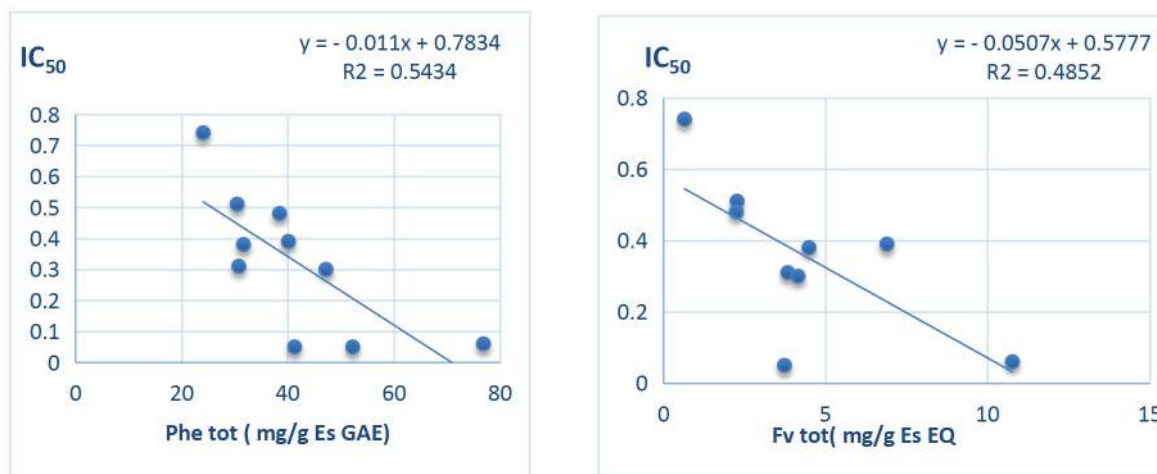
**Figure 29:** Valeurs IC<sub>50</sub> de test DPPH des extraits polaires des différentes parties de *Thapsia garganica*

De nombreuses études ont suggéré que la capacité antioxydante des extraits de plantes est corrélée avec la teneur en composés phénoliques (Wojdylo et *al.*, 2007). En évaluant le potentiel antioxydant de cinq extraits de plantes appartenant à la famille des Apiaceae, Christova-Bagdassarian et *al.*, (2013) ont conclu que le potentiel antioxydant le plus important était celui de l'extrait de plantes le plus élevé en polyphénols.

Dans cette étude, une forte corrélation négative est observée entre la composition en polyphénols et celles des IC<sub>50</sub> de nos extraits avec un coefficient de Pearson de -0,737\* ( p 0,015), indiquant la contribution des composés phénoliques au pouvoir de capture des radicaux libres DPPH de nos extraits (Figure30).

La corrélation entre le pouvoir réducteur de nos extraits et celui de la composition en flavonoïde semble être moins importante avec un coefficient de Pearson de -0,591 (Figure 35) et une valeur P égale à 0,072, cela montre que cette corrélation n'est pas statistiquement significative et peut être due au hasard.

Il est à noter que cette étude de corrélation ne permet pas de tirer des conclusions définitives sur l'effet de la teneur en composés phénoliques. En effet, la détermination colorimétrique des composés phénoliques et flavonoïdes intègre plusieurs structures même celles qui ne contribuent pas à l'activité antioxydante. De plus, l'activité antioxydante dépend non seulement de la concentration, mais aussi de la structure des antioxydants.



**Figure 30:** Régression linéaire entre les valeurs IC<sub>50</sub> et les taux de phénols et de flavonoïdes

Pour les extraits lipidiques, nous avons obtenu des variations très importantes entre les valeurs IC<sub>50</sub> des extraits hexaniques de *Thapsia garganica* (Figure31), en particulier entre les graines (mûres et immatures) et celles des feuilles et des racines, de sorte que l'huile des graines mûres est 24 fois plus faible que l'huile des feuilles et 29 fois plus faible que l'huile des racines alors que les graines immatures ont une activité antiradicalaire légèrement plus puissante que les graines mûres.



**Figure 31:** Valeurs  $IC_{50}$  de test DPPH pour les extraits lipidiques de *Thapsia garganica*

En comparant les  $IC_{50}$  des différents extraits hexaniques et insaponifiables de *Thapsia garganica* avec celle de la vitamine E, on constate que l'activité antiradicalaire de tous nos extraits est inférieure à la capacité de rétention du radical DPPH de la substance de référence. Cette capacité est plus importante pour les insaponifiables avec des  $IC_{50}$  qui varient entre ( $0,68 \pm 0,01$  mg/ml) pour les feuilles et ( $4,16 \pm 0,05$  mg/ml) pour les graines immatures.

Nous avons remarqué dans cette étude, que les insaponifiables des graines matures et immatures sont trop actives par rapport à leurs huiles (de 6 à 29 fois) alors que les insaponifiables des racines et feuilles ont une  $IC_{50}$  proche de leurs huiles (de 1,2 à 1,9 fois plus active). Ceci s'explique peut être par la forte teneur en insaponifiables dans les huiles de feuilles et de racines par rapport aux graines (mentionné auparavant dans le Chapitre 2).

### 3. 2. Test FRAP

Le test du FRAP semble être un test prometteur et potentiellement utile. Les réactifs sont peu coûteux, la procédure est rapide et simple, les résultats sont très reproductibles sur une large gamme de concentrations et l'équipement requis est d'un type couramment utilisé dans les laboratoires de biochimie (Benzie et Strain, 1996). Ce test mesure le pouvoir réducteur en milieu acide.

C'est une méthode de mesure de la puissance des substances contenues dans nos extraits pour réduire le fer ferrique  $Fe^{3+}$  en fer ferreux  $Fe^{2+}$  qui est un des mécanismes antioxydants. La capacité réductrice d'un composé peut servir d'indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle. De nombreuses publications actuelles ont indiqué qu'il existe une relation directe entre les activités antioxydantes et le pouvoir réducteur des composants de certaines plantes.

Les résultats de ce test peuvent être exprimés de plusieurs manières : soit en équivalent acide ascorbique en utilisant la courbe de variation de l'absorbance de la vitamine C en fonction de la concentration, en comparant les courbes de variation de l'absorbance en fonction de la concentration des extraits avec celles des références ou en calculant le paramètre  $IC_{50}$ .

Dans notre travail, nous avons testé les différents extraits polaires de *Thapsia garganica* selon la méthode FRAP, et les résultats obtenus nous ont permis de tracer des courbes de variation de l'inhibition en fonction de la concentration de chaque extrait (Annexe 2). Sur la base de ces résultats, nous avons calculé le paramètre  $IC_{50}$  pour chaque extrait et les résultats sont présentés dans le Tableau 14.

**Tableau 14:** Valeurs  $IC_{50}$  de test FRAP pour les différents extraits de *Thapsia garganica* exprimées en mg/ml

	Dichlorométhane	Acétate d'éthyle	Méthanol
<b>Feuilles</b>	0,2± 0,0188	0,12±0.004	0,18±0,01
<b>Racines</b>	1,4±0,014	0,033±0,000	0,5±0,009
<b>Graine m</b>	0.27±0,04	0,17±0,003	0,016±0,00
<b>Graine im</b>	0,32±0,009	0,17±0,005	0,0072±0,000
<b>Vit C</b>	0.003±0.00		

Le Tableau 14 montre que tous nos extraits ont des activités antioxydantes significativement plus faibles que la référence (acide ascorbique), pour cette dernière la réduction est presque totale à partir d'une concentration de 0,1 mg/ml (Figure 32).

Cette réduction est beaucoup plus importante dans les extraits méthanoliques de graines et l'extrait d'acétate d'éthyle de racines. Si nous classons nos extraits selon la puissance de réduction de fer par rapport à l'acide ascorbique, nous obtiendrons l'ordre suivant : acide ascorbique > MeOH Gim > MeOH Gm > Ac-o-Et R > Ac-o-Et F > Ac-o-Et (Gm, Gim) > MeOH F > MeOH R > DCM F > DCM Gm > DCM Gim > DCM R. généralement, les extraits méthanoliques et les extraits d'acétate éthyle sont de bons réducteurs comparés à la vitamine C qui est considérée comme un antioxydant pur.

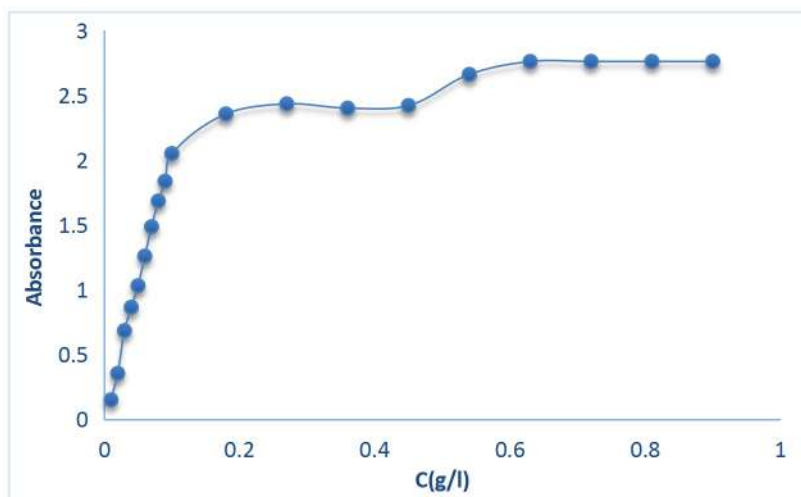


Figure 32: Courbe de réduction de la Vitamine C

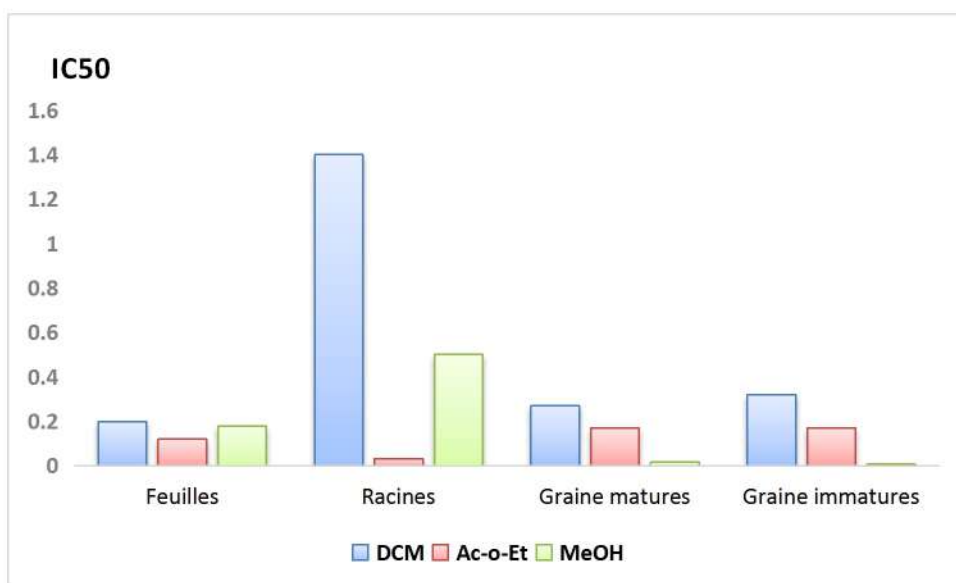


Figure 33: Valeurs IC<sub>50</sub> de test FRAP des différents extraits de *Thapsia garganica*

L'histogramme de la Figure 33 montre que les différents extraits de graines matures et immatures ont des capacités similaires de réduction du fer ferrique Fe<sup>3</sup>, et que cette activité est proportionnelle à la polarité du solvant. Cette corrélation entre la polarité et l'activité antioxydante a été remarquée dans le test DPPH pour différentes parties de la plante et non pas seulement pour les graines.

Après l'analyse de ces résultats, nous n'avons pas trouvé de corrélation ( $r=0,11$ ) entre le pouvoir antioxydant de la IC<sub>50</sub> et la teneur totale en phénol et en flavonoïdes. Ce résultat s'explique par le fait que la capacité de réduction du fer ferrique Fe<sup>3</sup> de nos extraits ne dépend pas nécessairement de la teneur en composés phénoliques mais de leurs structures chimiques, ou d'autres composés qui ne sont pas phénoliques, à savoir les alcaloïdes et terpénoïdes.

### Conclusion

En conclusion, les extraits polaires de *Thapsia garganica* ont montré une richesse en composés phénoliques et flavonoïdes, avec une différence significative entre les différentes parties étudiées. Les résultats obtenus montrent que le méthanol peut être un bon extracteur des composés phénoliques à partir de cette plante.

L'étude de l'activité antioxydante des différents extraits par les deux tests DPPH et FRAP montre une activité importante des extraits méthanoliques surtout ceux des graines,

L'étude de l'activité antioxydante des huiles et des insaponifiables de *Thapsia garganica* par le test DPPH montre une très forte activité des huiles de racines et de feuilles par rapport aux graines, ainsi qu'une forte activité des insaponifiables par rapport à leurs huiles pour toutes les parties étudiées mais avec une différence plus significative entre l'activité des huiles de graines et celle de leurs insaponifiables.

Une corrélation significative est obtenue entre la capacité de piégeage du radical DPPH et celle de la composition en polyphénols, tandis qu'aucune corrélation n'est trouvée entre les résultats des tests FRAP et ceux des compositions en polyphénols ou flavonoïdes.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AHARONI, Asaph, KEIZER, Leopold CP, BOUWMEESTER, Harro J., *et al.* Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. *The Plant Cell*, 2000, vol. 12, no 5, p. 647-661.
- AHSAN, H., ALI, A., et ALI, R. Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. *Clinical & Experimental Immunology*, 2003, vol. 131, no 3, p. 398-404.
- ARCEUSZ, Agnieszka, WESOŁOWSKI, Marek, et KONIECZYNSKI, Pawel. Methods for extraction and determination of phenolic acids in medicinal plants: a review. *Natural product communications*, 2013, vol. 8, no 12, p. 1934578X1300801238.
- BALBOUL, Basma AAA, AHMED, Ahmed A., OTSUKA, Hideaki, *et al.* A guaianolide and a germacranolide from *Achillea santolina*. *Phytochemistry*, 1997, vol. 46, no 6, p. 1045-1049.
- BAYDAR, Hasan, SAĞDIÇ, Osman, ÖZKAN, Gülcan, *et al.* Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food control*, 2004, vol. 15, no 3, p. 169-172.
- BECKMAN, Kenneth B. et AMES, Bruce N. The free radical theory of aging matures. *Physiological reviews*, 1998, vol. 78, no 2, p. 547-581.
- BENZIE, Iris FF et STRAIN, John J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 1996, vol. 239, no 1, p. 70-76.
- BIESALSKI, Hans Konrad, BÖHLES, H., ESTERBAUER, H., *et al.* Antioxidant vitamins in prevention. *Clinical Nutrition*, 1997, vol. 16, no 3, p. 151-155.
- BLOOR, Stephen J. Overview of methods for analysis and identification of flavonoids. In : *Methods in enzymology*. Academic press, 2001. p. 3-14.
- BRAND-WILLIAMS, Wendy, CUVELIER, Marie-Elisabeth, et BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 1995, vol. 28, no 1, p. 25-30.
- BUCHANAN, Bob B., GRUISSEM, Wilhelm, et JONES, Russell L. (ed.). *Biochemistry and molecular biology of plants*. John Wiley & Sons, 2015.
- BUCHANAN, Bob B., GRUISSEM, Wilhelm, et JONES, Russell L. (ed.). *Biochemistry and molecular biology of plants*. John Wiley & Sons, 2015.
- CHRISTOVA-BAGDASSARIAN, Valentina Lubomirova, BAGDASSARIAN, Kristine Samvel, et ATANASSOVA, M. S. Phenolic profile, antioxidant and antimicrobial activities from the Apiaceae family (dry seeds). *Mintage Journal of Pharmaceutical and Medical Sciences*, 2013, vol. 2, no 4, p. 26-31.
- CILLARD, Josiane et CILLARD, Pierre. Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oleagineux, corps gras, lipides*, 2006, vol. 13, no 1, p. 24-29.
- CROZIER, Alan, CLIFFORD, Mike N., et ASHIHARA, Hiroshi (ed.). *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*. John Wiley & Sons, 2008.
- DEWICK, Paul M. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. John Wiley & Sons, 3ème édition, 2009, p 539

- DJERIDANE, A., YOUSFI, M., NADJEMI, B., *et al.* Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food chemistry*, 2006, vol. 97, no 4, p. 654-660.
- FAVIER, Alain. Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 2003, vol. 108.
- FLORES, María Isabel Alarcón, ROMERO-GONZÁLEZ, Roberto, FRENICH, Antonia Garrido, *et al.* Analysis of phenolic compounds in olive oil by solid-phase extraction and ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food chemistry*, 2012, vol. 134, no 4, p. 2465-2472.
- GEHIN, Audrey, GUYON, Catherine, et NICOD, Laurence. Glyphosate-induced antioxidant imbalance in HaCaT: The protective effect of Vitamins C and E. *Environmental toxicology and pharmacology*, 2006, vol. 22, no 1, p. 27-34.
- GINER-CHAVEZ, Bertha Iliana. Condensed tannins in tropical forages. 1997.
- GRAILLE, Jean. *Lipides et corps gras alimentaires*. Lavoisier Tec et Doc, 2003.
- GUARESCHI, Icilio. *Einführung in das Studium der Alkaloide mit besonderer Berücksichtigung der vegetabilischen Alkaloide und der Ptomaine: Mit Genehmigung des Verfassers in deutscher Bearbeitung herausg. von Hermann Kunz-Krause*. R. Gaertner, 1896.
- GUARESCHI, Icilio. *Einführung in das Studium der Alkaloide mit besonderer Berücksichtigung der vegetabilischen Alkaloide und der Ptomaine: Mit Genehmigung des Verfassers in deutscher Bearbeitung herausg. von Hermann Kunz-Krause*. R. Gaertner, 1896.
- HARTMAN, Thomas G., KARMAS, Karl, CHEN, Judy, *et al.* Determination of Vanillin, Other Phenolic Compounds, and Flavors in Vanilla Beans: Direct Thermal Desorption—Gas Chromatography and—Gas Chromatography—Mass Spectrometry Analysis.
- HARTMANN, THOMAS. Alkaloids. In : *Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites*. Academic press, 1991. p. 79-121.
- HENNEBELLE, T., SAHPAZ, S., et BAILLEUL, F. Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 2004, vol. 2, no 1, p. 3-6.
- HESSE, Manfred. *Alkaloids: nature's curse or blessing?*. John Wiley & Sons, 2002.
- HESSE, Manfred. *Alkaloids: nature's curse or blessing?*. John Wiley & Sons, 2002.
- HU, Jiang, SHI, Xiaodong, CHEN, JIANGANG, *et al.* Alkaloids from *Toddalia asiatica* and their cytotoxic, antimicrobial and antifungal activities. *Food chemistry*, 2014, vol. 148, p. 437-444.
- IGNAT, Ioana, VOLF, Irina, et POPA, Valentin I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food chemistry*, 2011, vol. 126, no 4, p. 1821-1835.
- KANG, Dae Gill, KEUN YUN, Chi, et LEE, Ho Sub. Screening and comparison of antioxidant activity of solvent extracts of herbal medicines used in Korea. *Journal of Ethnopharmacology*, 2003, vol. 87, no 2-3, p. 231-236.
- KRIEF, Sabrina. *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*. 2003. Thèse de doctorat. Museum national d'histoire naturelle-MNHN PARIS.

LEHUCHER-MICHEL, M. P., LESGARDS, J. F., DELUBAC, O., *et al.* Stress oxydant et pathologies humaines: Bilan et perspectives préventives. *La Presse médicale*, 2001, vol. 30, no 21, p. 1076-1081.

LI, Zhiling, SHI, Wenxia, CHENG, Lidong, *et al.* Screening of the phenolic profile and their antioxidative activities of methanol extracts of *Myrica rubra* fruits, leaves and bark. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2018, vol. 12, no 1, p. 128-134.

MABRY, Tom J., MARKHAM, K. R., et THOMAS, M. B. The ultraviolet spectra of flavones and flavonols. In : *The systematic identification of flavonoids*. Springer, Berlin, Heidelberg, 1970. p. 41-164.

MACHEIX, Jean-Jacques, FLEURIET, Annie, et JAY-ALLEMAND, Christian. *Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. PPUR presses polytechniques, 2005.

MACHLIN, Lawrence J. et BENDICH, Adrienne. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *The FASEB Journal*, 1987, vol. 1, no 6, p. 441-445.

MARTINEZ-CAYUELA, M. Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*, 1995, vol. 77, no 3, p. 147-161.

MARTINS, Natália, BARROS, Lillian, SANTOS-BUELGA, Celestino, *et al.* Antioxidant potential of two Apiaceae plant extracts: A comparative study focused on the phenolic composition. *Industrial Crops and Products*, 2016, vol. 79, p. 188-194.

MEISSNER, C. F. W. Über Pflanzenalkalien: II. Über ein neues Pflanzenalkali (Alkaloid). *J. Chem. Phys*, 1819, vol. 25, p. 377-381.

MOHAMMEDI, Zohra et ATIK, Fawzia. Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *Tamarix aphylla* (L.) Karst. 2011.

MOLYNEUX, Philip, *et al.* The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn J. Sci. Technol*, 2004, vol. 26, no 2, p. 211-219.

NEFFATI, N., ALOUI, Z., KAROUÏ, H., *et al.* Phytochemical composition and antioxidant activity of medicinal plants collected from the Tunisian flora. *Natural product research*, 2017, vol. 31, no 13, p. 1583-1588.

PELLETIER, S. William (ed.). *Alkaloids: chemical and biological perspectives*. 1983.

PELLETIER, S. William (ed.). *Alkaloids: chemical and biological perspectives*. 1983.

PHD, Okezie I. Aruoma. Free radicals, antioxidants and international nutrition. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 1999, vol. 8, no 1, p. 53-63.

QUETTIER-DELEU, Christel, GRESSIER, Bernard, VASSEUR, Jacques, *et al.* Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *Journal of ethnopharmacology*, 2000, vol. 72, no 1-2, p. 35-42.

REVUZ, J.E.R. Conservateurs. *Encyclopédie médico-chirurgicale*. Editions scientifiques et médicales.

- SAKIHAMA, Yasuko, COHEN, Michael F., GRACE, Stephen C., *et al.* Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, 2002, vol. 177, no 1, p. 67-80.
- Saleem, F., Sarkar, D., Ankolekar, C., & Shetty, K. (2017). Phenolic bioactives and associated antioxidant and anti-hyperglycemic functions of select species of Apiaceae family targeting for type 2 diabetes relevant nutraceuticals. *Industrial Crops and Products*, 107, 518-525.
- SALIM, Angela A., CHIN, Young-Won, et KINGHORN, A. Douglas. Drug discovery from plants. In : *Bioactive molecules and medicinal plants*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2008. p. 1-24.
- SCHOLZ, Eberhard et RIMPLER, Horst. Proanthocyanidins from Krameria triandra root. *Planta Medica*, 1989, vol. 55, no 04, p. 379-384.
- SHEN, Jinchao et SHAO, Xueguang. A comparison of accelerated solvent extraction, Soxhlet extraction, and ultrasonic-assisted extraction for analysis of terpenoids and sterols in tobacco. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2005, vol. 383, no 6, p. 1003-1008.
- SOCZEWIŃSKI, E., WOJCIAK-KOSIOR, M., et MATYSIK, G. Analysis of glycosides and aglycones of flavonoid compounds by double-development thin-layer chromatography. *JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, 2004, vol. 17, no 4, p. 261-263.
- SOCZEWIŃSKI, E., WOJCIAK-KOSIOR, M., et MATYSIK, G. Analysis of glycosides and aglycones of flavonoid compounds by double-development thin-layer chromatography. *JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, 2004, vol. 17, no 4, p. 261-263.
- SRIPAD, G., PRAKASH, V., et RAO, MS Narasinga. Extractability of polyphenols of sunflower seed in various solvents. *Journal of Biosciences*, 1982, vol. 4, no 2, p. 145-152.
- TLILI, Nizar, MEJRI, Houda, LAJNEF, Houda Ben, *et al.* 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*, 2015, vol. 92, no 8, p. 1175-1181.
- VALKO, Marian, LEIBFRITZ, Dieter, MONCOL, Jan, *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2007, vol. 39, no 1, p. 44-84.
- VRANOVÁ, Eva, COMAN, Diana, et GRUISSEM, Wilhelm. Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. *Annual review of plant biology*, 2013, vol. 64, p. 665-700
- WOJDYŁO, Aneta, OSZMIAŃSKI, Jan, et CZEMERYYS, Renata. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food chemistry*, 2007, vol. 105, no 3, p. 940-949.
- WOJDYŁO, Aneta, OSZMIAŃSKI, Jan, et CZEMERYYS, Renata. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food chemistry*, 2007, vol. 105, no 3, p. 940-949.
- YANG, De-Lan, MEI, Wen-Li, WANG, Hui, *et al.* Antimicrobial alkaloids from the tubers of *Stephania succifera*. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 2010, vol. 65, no 6, p. 757-761.

## Chapitre IV

# *Inhibition de la réaction enzymatique de la lipase de *Candida rugosa**

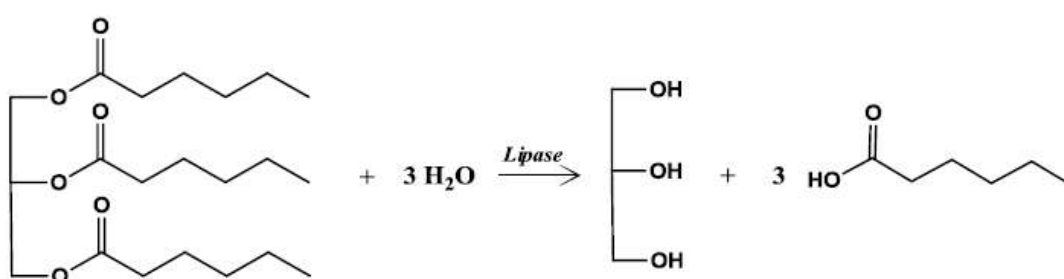
## RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

### 1. Lipases

Les lipases (E. C.3.1.1.3) forment une famille hétérogène d'enzymes capables d'hydrolyser les triglycérides en glycérol et en acides gras correspondants (Figure 34). Elles ont été mises en évidence dès 1901, chez des bactéries telles que *Bacillus prodigiosus*, *Bacillus pyocyaneus* et *Bacillus fluorescens* (dénommées respectivement *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens*) (Eijkmann et al., 1901)

Chez l'homme, ainsi que chez d'autres vertébrés, les lipases interviennent dans le contrôle de la digestion, de l'absorption et de la reconstitution des graisses. Les lipases de mammifères peuvent être classées en trois groupes. Le premier est constitué par les lipases associées à la digestion, telles que les lipases linguale, pharyngale, gastrique et pancréatique. Le second groupe correspond aux lipases présentes dans le cerveau, les muscles, les artères, les reins, la rate, la langue, le foie et les tissus adipeux. Le troisième groupe correspond aux lipases produites par les glandes galactogènes produisant le lait maternel (Baba et al., 1991 ; Fickers et al., 2008).

Les enzymes des bactéries et des mycètes ont le plus grand potentiel en tant que biocatalyseurs industriels puisqu'elles sont habituellement résistantes, faciles à produire par la fermentation et facile à récupérer le bouillon de culture. Par conséquent, un grand nombre d'enzymes microbiennes peut être obtenu à partir des producteurs commerciaux (Müller et Petry, 2004).

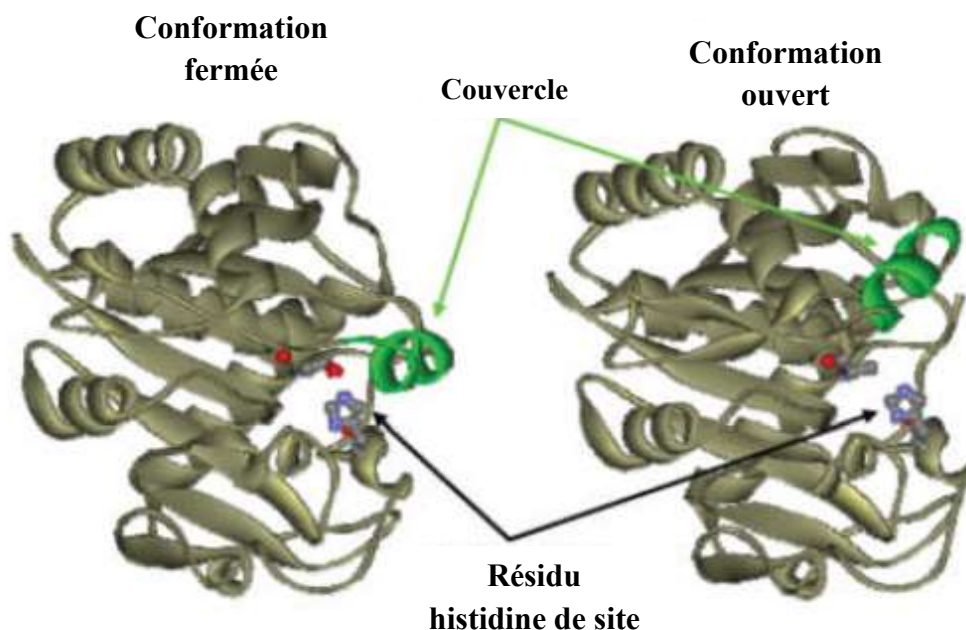


**Figure 34:** La réaction d'hydrolyse d'un triglycéride par la lipase (Jaeger et al., 1994).

## **2. Mécanismes catalytiques**

Les lipases, dont la fonction biologique première est d'assurer le catabolisme des triacylglycérols, également appelés triglycérides (~ 90% des lipides alimentaires), en acides gras et en glycérol, présentent la particularité de reconnaître une large gamme de substrats distincts. En outre, les lipases peuvent être extraites de différentes souches, animales, végétales ou microbiennes (Jaeger et Manfred, 1998 ; Jaeger et Thorsten, 2002). Néanmoins, en dépit d'une certaine hétérogénéité des séquences peptidiques recensées, les lipases, au sens strict, présentent une structure tridimensionnelle commune, caractérisée par un repliement dit  $\alpha/\beta$  (alternance d'hélices  $\alpha$  et de feuillets  $\beta$ ) (Ollis et al., 1992), une triade catalytique Sérine-Aspartate/Glutamate-Histidine typique, et la présence d'une hélice  $\alpha$  mobile, appelé « couvercle » ou « volet », pouvant recouvrir le site actif (Figure 35).

En effet, dans un milieu aqueux homogène (les lipases sont hydrosolubles), le site actif est préférentiellement isolé par une boucle polypeptidique amphiphile hélicoïdale. L'enzyme est alors en conformation dite « fermée », ou plus précisément, dans un état d'équilibre déplacé vers la conformation « fermée ». Cependant, en présence d'une interface hydrophobe (Reis et al., 2006), induite par une goutte d'huile (triglycéride) (Miled et al., 2001), un solvant organique, un support solide (Reetz et al., 1996) ou une protéine appropriée (Palomo et al., 2003), l'ouverture du « couvercle » est favorisée. Ainsi, en conformation dite « ouverte » ou « active » (ou plus précisément, dans un état d'équilibre déplacé vers la conformation « ouverte »; (Figure 39), la face hydrophobe de la boucle polypeptidique, initialement orientée vers l'intérieur du site actif, interagit préférentiellement avec l'interface et expose les groupements catalytiques de l'enzyme au milieu réactionnel. Ce mécanisme complexe, nommé « activation interfaciale », a été très largement étudié (Brzozowski et al., 1991)



**Figure 35 :** Représentations de la structure de la lipase extraite de *Thermomyces lanuginosus* en conformations « fermé » et « ouverte ». Le « couvercle » est une hélice  $\alpha$  mobile, indiquée en vert sur le schéma (Ollis et al., 1992).

### 3. Intérêt de l'inhibition de la lipase

Les triacylglycérols acyl-hydrolases, ou lipases (E. C.3.1.1.3), sont des enzymes atypiques par leur mécanisme d'action et leur spécificité de substrats. En fonction du micro-environnement de l'enzyme, elles peuvent agir en tant qu'hydrolases en milieu aqueux ou comme catalyseurs en synthèse organique. En tant qu'hydrolases, elles sont responsables du catabolisme des triglycérides, leurs substrats préférentiels, en acide gras et en glycérol [ Klibanov, 2001 et A M Klibanov;1985).

Une perturbation du métabolisme des lipides dans le corps humain peut entraîner le développement de nombreuses maladies, telles que le diabète et les maladies cardiovasculaires, deux des principales causes de morbidité et de mortalité dans les pays industrialisés ( Stitzel,2017). L'inhibition des lipases est l'un des mécanismes les plus utilisés pour réduire l'adsorption des graisses par inhibition de l'hydrolyse des triacylglycérols chez les personnes en surpoids souffrant d'hypertension, de diabète, de cholestérol élevé et de maladies cardiaques (Hauptman,1992; Drent et Van der ,1993).

Une autre direction d'utilisation de l'inhibition de la lipase consiste à bloquer l'effet pathogène de certains microorganismes qui produisent des lipases extracellulaires pour coloniser la peau et les muqueuses de l'homme et des animaux (Grippa et *al.*, 1999). Par conséquent, l'étude de nouveaux inhibiteurs naturels de la lipase a suscité un grand intérêt

Plusieurs composés utiles dans la thérapie de ces maladies ont démontré une activité antilipase élevée : le tétracycline et autres médicaments anti-acné pour l'inhibition de la lipase de *P. acnes* (Higaki, 2003), le sucralfate et autres médicaments antiulcère pour l'inhibition de l'activité lipolytique de *H. pylori* (Slomiany et *al.*, 1994), l'orlistat (Xenical), le tetrahydro-derivé de lipstatine, est utilisé couramment dans le traitement de l'obésité sévère (Eisenreich et *al.*, 2003)

Les métabolites secondaires des plantes ont montré qu'ils sont très utiles dans la prévention et le traitement de nombreuses maladies (Singh et *al.*, 2003). Ils sont une source prometteuse d'inhibiteurs de lipases car ils sont présents à des concentrations élevées dans les extraits végétaux et capables d'inhiber la lipase pancréatique porcine (Shimura et *al.*, 1992). En outre, ces composés sont également présents dans plusieurs extraits de plantes utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement de maladies liées à la présence de lipase telles que l'ulcère gastrique (Borrelli et Izzo, 2000) ou de l'acné (Higaki, 2003).

## **MATERIEL ET METHODES**

Pour notre étude, le choix de la lipase a été motivé principalement pour les raisons suivantes:

- Une enzyme facilement disponible chez plusieurs fournisseurs et elle est utilisée dans différentes applications industrielles ou de laboratoire,
- Il existe des substrats synthétiques couramment commercialisés permettant une mesure simple et précise de son activité enzymatique à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible.

### 1.Extraction des métabolites secondaires

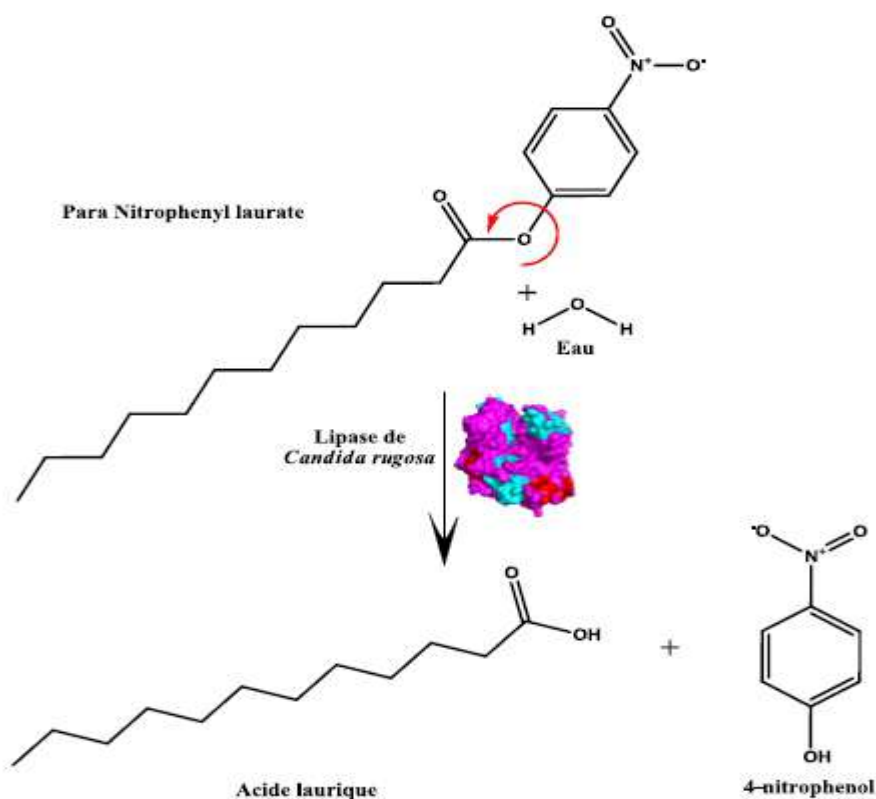
Les feuilles et les racines de *Thapsia garganica* ont été collectées en mars 2016 , alors que les graines ont été collectées en juin de la même année. Les trois parties de la plante ont été séchées à l'air ensuite broyées en une poudre fine. Une quantité de 50 g de poudre végétale des différentes parties (racines, feuilles, graines) est macérée dans un volume approprié (200 ml) d'hexane pendant 24 h à température ambiante et à l'obscurité afin d'éliminer les lipides et les pigments. Après filtration, le résidu obtenu est macéré avec un volume de 300 ml d'acétate d'éthyle pendant 48 h à température ambiante et à l'obscurité. Les fractions d'acétate d'éthyle ont été séchées par addition d'une quantité suffisante de sulfate de sodium anhydre, puis évaporées sous vide à 40 °C. Les résidus secs recueillis sont stockés à + 4 °C jusqu'à leur utilisation .

### 3. Activité enzymatique de la lipase *Candida rugosa* :

La lipase de *Candida rugosa* et tous les autres réactifs ont été achetées à partir Sigma-Aldrich. Tous les autres produits chimiques et solvants utilisés étaient de qualité analytique.

La technique physico-chimique utilisée pour étudier la cinétique de l'hydrolyse de l'ester par la lipase microbienne est la spectrophotométrie UV-Visible (405nm). Dans cette étude, nous nous intéressons à l'apparition du produit d'une coloration jaune le para-nitrophénol (p-NP) en suivant l'évolution de sa densité optique. Le p-NP se produit de l'hydrolyse de para-nitrophényllaurate (p-NPL) en présence de la lipase microbienne selon l'équation de la réaction suivante(Figure 36):





**Figure 36:** Schéma réactionnel de l'hydrolyse de p-NPL par la lipase microbienne (Benarous, 2010)

### 3. Tests d'inhibition de l'activité de la lipase.

Dans le but d'étudier l'effet de *Thapsia garganica* sur la lipase de *Candida rugosa* (LCR) et de déterminer le paramètre d'inhibition IC<sub>50</sub> (la concentration nécessaire de l'inhibiteur pour inhiber 50 % de l'enzyme ou diminuer 50 % de l'activité enzymatique), nous avons procédé à la méthode décrite par Benarous et al (2013). Après avoir testé l'activité inhibitrice des extraits de *Thapsia garganica* qui ont donné une inhibition importante (> 50%) nous avons procédé à la détermination de leurs paramètres IC<sub>50</sub>.

Le milieu réactionnel contient 100 µl de l'extrait dilué et 100 µl de la LCR de 0,5 mg/ml a été pré-incubé dans un bain marie à 37°C pendant 15 min, la réaction a été déclenchée par l'ajout de 900 µl de p-NPL (préparé dans un tampon phosphate pH7) pendant 15 min. La lecture de l'absorbance des échantillons est effectuée immédiatement à l'aide d'un spectrophotomètre modèle SP\_3000 nano, à une longueur d'onde de 405 nm contre un blanc.

Une unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme qui libère 1  $\mu\text{mol}$  de p-NP par minute dans les conditions de dosage décrites ci-dessus. La cinétique d'inhibition a été réalisée en utilisant différentes concentrations d'extraits. Toutes les expériences ont été effectuées au moins trois fois. Les valeurs des  $\text{IC}_{50}$  ont été déterminées de la représentation graphique  $I \% = f(I)$  tel que  $I \%$  est déterminée suivant cette relation :

$$I\% = \left( 1 - \frac{A_{\text{extrait}}}{A_{\text{control}}} \right) * 100$$

Avec :  $I \%$  : le pourcentage d'inhibition.

$A_{\text{extrait}}$  : l'absorbance de l'activité lipolytique en présence de l'extrait végétal.

$A_{\text{control}}$  : l'absorbance de l'activité lipolytique en absence de l'extrait végétal

#### 4. Analyse statistique

Les résultats sont présentés par la moyenne avec son écart type ( $n=3$ ) pour chaque cas.

#### 5. Docking moléculaire

La bio-informatique est constituée par l'ensemble des concepts et des techniques nécessaires à l'interprétation de l'information génétique (séquences) et structurale (repliement 3D). C'est le décryptage de la bio-information. Son but, comme tout volet théorique d'une discipline, est d'effectuer la synthèse des données disponibles et d'énoncer des hypothèses généralisées .

Les structures de thapsigargine, thapsigargicine, tribolid, notrilobolid et la thapsivillosine C ont été obtenues de la base de données Pub Chem compound et leurs charges de gasteiger ont été ajoutées à l'aide du logiciel d' Autodock tools. La structure 3D de la lipase de *C. rugosa* (PDB ID: 1CRL) et de la lipase pancréatique humaine (LPA)(PDB ID: 1LPA) ont été obtenues à partir de la banque de données protéiniques (PDB:Protein Data Bank ). Pour les études d'amarrage, la protéine initiale a été préparée en éliminant toutes les molécules d'eau et les ligands. Il est bien connu que les fichiers PDB ne contiennent pas d'hydrogènes. Par conséquent, les hydrogènes polaires et les charges partielles ont été ajoutés à la structure. Le nombre d'analyses effectuées est 50 avec 20 solutions pour chaque analyse pour la LCR , ce qui nous donne 1 000 solutions ,

et 50 analyses avec une solution pour chaque analyse pour la LPA. Toutes ces solutions sont bien traitées et nous n'avons accepté que des conformations avec des liaisons à faible énergie. Les paramètres de docking utilisés sont les mêmes que ceux publiés par Benarous et *al.*, 2015 pour la CRL

## **RÉSULTATS ET DISCUSSIONS**

### **1. Inhibition de la réaction catalysée par la lipase**

Les rendements en extrait pour les trois parties étudiées dans ce travail sont montrés dans le Tableau 15. Le classement des rendements obtenus, qui varient de 0,58 % pour les racines à 7,1 % pour les graines, est similaire à celui obtenu dans le troisième chapitre malgré la modification des conditions d'extraction (solvant, temps d'extraction, méthode d'extraction et l'année de récolte de la plante...ect).

Les produits phytochimiques identifiés à partir des plantes médicinales traditionnelles représentent une opportunité intéressante pour le développement de nouveaux traitements inhibiteurs de lipases, mais très peu d'études sont concentrées sur les lipases microbiennes et végétales. Cependant, ces lipases sont également impliquées dans plusieurs altérations alimentaires.

À partir de l'étude bibliographique sur la fonction physiologique de la lipase et le rôle de ses inhibiteurs dans le traitement de plusieurs maladies. Nous avons évalué le pouvoir inhibiteur des extraits acétate d'éthyle de notre plante sur l'activité de cette enzyme dans le but de trouver de nouveaux inhibiteurs. Cette étude est la première à évaluer l'effet inhibiteur des extraits de *Thapsia garganica* sur la lipase de *Candida rugosa*. Nous avons tracé les courbes représentant la variation de l'inhibition en fonction des concentrations de nos extraits exprimées en mg/ml pour une seule concentration de substrat, les courbes sont présentées dans la Figure 37. Les valeurs des IC<sub>50</sub> (Tableau 15) sont déterminées en mg/ml à partir des représentations graphiques et calculées aussi en mM en tenant compte que la masse molaire moyenne des composés phénoliques égale à 500g/mol.

Les résultats obtenus ont révélé une activité puissante de nos extraits avec une différence entre les activités des feuilles, racines et graines. Ce qui révèle une différence

dans la nature et le nombre des groupements fonctionnels entre les différentes parties de la plante. Ainsi les graines qui présentaient les quantités les plus élevées en composés phénoliques et l'activité antioxydante la plus importante, ont donné l'activité

inhibitrice la plus élevée vis-à-vis de la lipase de *Candida rugosa* avec une  $IC_{50}$  de 1,19 mg / ml, alors que les feuilles ont donné l'activité la plus faible avec une  $IC_{50}$  de 1,96 mg / ml, et les racines ont une  $IC_{50}$  de 1,87 mg / ml.

**Tableau 15:** Rendement d'extraction et les valeurs de  $IC_{50}$  des extraits de *Thapsia garganica*

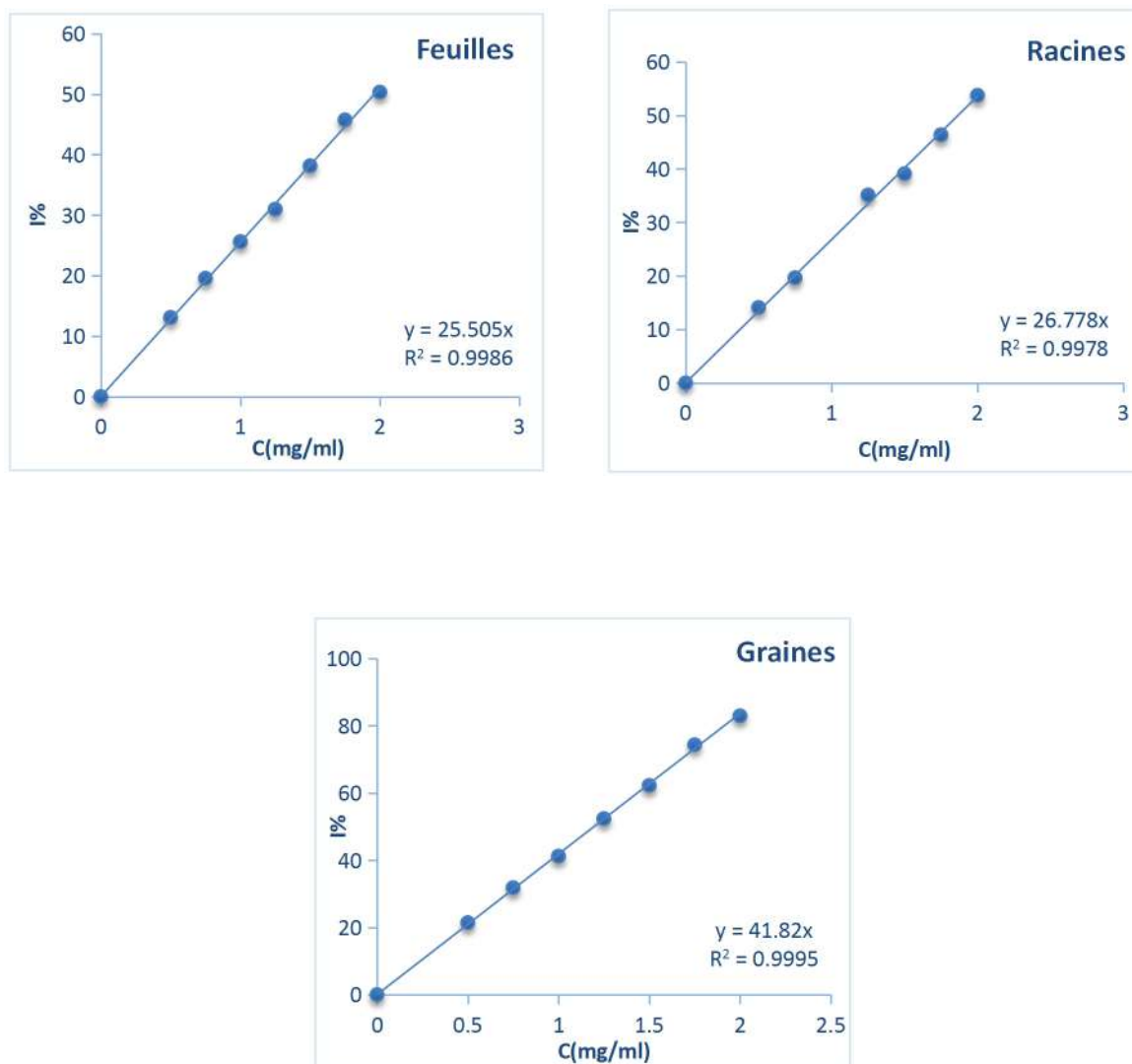
Partie	Rendement (%)	$IC_{50}$ (mg/ml)	$IC_{50}$ (mM) <sup>a</sup>
Feuilles	2,40	1,96±0.12	3,92
Graines	7,10	1,19±0.11	2,389
Racines	0,58	1,87±0.10	3,74

Afin d'estimer l'efficacité de *T. garganica* à inhiber l'activité de lipase, nous avons regroupé dans le Tableau 16 plusieurs résultats obtenus des études récentes portant sur l'inhibition de la lipase par différentes sources avec leur  $CI_{50}$  et le type d'enzyme étudié.

Selon ces études, la valeur de la  $IC_{50}$  est influencée par plusieurs paramètres tels que le type de solvant, la source d'enzyme et la pureté de l'extrait étudié. Généralement, les extraits d'acétate d'éthyle de *Thapsia garganica* sont de bons inhibiteurs de la lipase par rapport aux autres extraits issus d'autres plantes publiés dans la littérature, tels que les extraits de dichlorométhane de *Peganum harmala* (Benarous et al., 2015), les extraits au butanol de *Zizyphus lotus* (Benarous et al., 2013), les extraits au méthanol de *Mentha viridis* et d'*Eucalyptus globulus* ( Belfeki et al., 2016) Cependant, ils sont moins puissants que d'autres extraits, tels que les extraits éthanoliques de *Chamomilla recutita* (Franco et al., 2016), *Bauhinia forficata* (Franco et al., 2016), *Kedrostis africana* (Unuofin et Otunola, 2018) et des molécules pures comme la saponine, la stépalagine (alcaloïde) et l'orlistat.

Plusieurs études réalisées sur l'étude de l'inhibition de la réaction enzymatique de la lipase par des terpénoïdes isolés à partir de plantes médicinales, ont montré que leur influence était prometteuse.

Dans cette étude, les activités inhibitrices des lipases testées d'extraits bruts de *Thapsia garganica*, une source importante de nombreux sesquiterpénoïdes (Makunga et al., 2003), sont largement inférieures à celles des terpénoïdes isolés des plantes comme *Calotropis procera* (Moon et kiim, 2018) et Ginkgo bilobathese (Ercan, 2016) qui sont 100 à 1000 fois plus actives que nos extraits (Tableau 16)



**Figure 37:** Représentations graphiques  $I\% = f(C)$  des différents extraits de *Thapsia garganica*.

Tableau 16: Valeurs d'IC<sub>50</sub> de quelque extraits naturels selon les références.

<i>plant</i>	<b>Solvant/ Molécule</b>	<b>IC<sub>50</sub> (mg/ml)</b>	<b>Lipase source</b>	<b>Référence</b>
<b><i>Peganum harmala</i></b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1,74	<i>Candida rugosa</i>	Benarous et al., 2015
<b><i>Peganum harmala</i></b>	Éthanol	0,83	<i>Candida rugosa</i>	Benarous et al., 2015
<b><i>Eucalyptus globulus</i></b>	Méthanol	0,69	<i>Aspergillus niger</i>	Belfeki et al., 2016
<b><i>Eucalyptus globulus</i></b>	Méthanol	1,29	Olive	Belfeki et al., 2016
<b><i>Mentha viridis</i></b>	Méthanol	0,43	<i>Aspergillus niger</i>	Belfeki et al., 2016
<b><i>Mentha viridis</i></b>	Méthanol	1,44	Olive	Belfeki et al., 2016
<b><i>Achillea santolina</i></b>	<i>Et-O-Ac</i>	0,37	<i>Candida rugosa</i>	Benarous et al., 2013
<b><i>Achillea santolina</i></b>	<i>Et -O- Ac</i>	4,83	<i>Candida rugosa</i>	Benarous et al., 2013
<b><i>Zizyphus lotus</i></b>	<i>Et -O- Ac</i>	0,45	<i>Candida rugosa</i>	Benarous et al., 2013
<b><i>Zizyphus lotus</i></b>	<i>Bu-OH</i>	8,27	<i>Candida rugosa</i>	Benarous et al., 2013
<b><i>Chamomilla recutita</i></b>	Ethanol	0,26	<i>Pancreas</i>	Franco et al., 2016
<b><i>Bauhinia forficata</i></b>	Ethanol	0,059	<i>Pancreas</i>	Franco et al., 2016
<b><i>Kedrostis africana</i></b>	Ethanol	0,38	<i>Pancreas</i>	Unuofin et Otunola , 2018
<b><i>Camellia japonica</i></b>	Ethanol	0,39	<i>Pancreas</i>	Moon et kiim.,2018
<b><i>Tribulus terrestris</i></b>	<i>Saponin</i>	0,01	<i>Pancreas</i>	<u>Ercan.</u> , 2016
<b><i>Annona crassiflora</i></b>	<i>Stephalagine</i>	8,35 .10 <sup>-3</sup>	<i>Pancreas</i>	Pereira et al., 2017
<b><i>Calotropis procera</i></b>	<i>Di-terpenoide</i>	0,01	<i>Pancreas</i>	Patil et al .,2015
<b><i>Ginkgo biloba</i></b>	<i>Ginkgolide A</i>	0,02	<i>Pancreas</i>	Bustanji et al.,2011
<b><i>Ginkgo biloba</i></b>	<i>Ginkgolide B</i>	0,09	<i>Pancreas</i>	Bustanji et al., 2011
<b><i>Ginkgo biloba</i></b>	<i>Bilobalide</i>	0,06	<i>Pancreas</i>	Bustanji et al., 2011
<b><i>Orlistat</i></b>	<i>Synthetic antiobesity drug</i>	0,06	<i>Candida rugosa</i>	Benarous et al., 2015

## 2. Docking des inhibiteurs sur la lipase de *Candida rugosa* :

Le Docking ou amarrage est l'insertion d'un ligand au niveau d'un site récepteur d'une macromolécule en utilisant des logiciels bio-informatique en collaboration avec l'algorithme génétique, ce phénomène est utilisé pour l'étude des réactions de complexation généralement dans le domaine pharmacologique afin de déterminer les différents paramètres de cette fixation ainsi que son mécanisme catalytique (Seal et *al.*, 2011).

Notre objectif de recherche est d'étudier l'inhibition de la lipase pancréatique humaine et de la lipase de *Candida rugosa* par les méthodes de modélisation moléculaire, et nous intéressons à déterminer le mode d'interaction du complexe (lipase- inhibiteur) pour la fixation de l'inhibiteur à l'enzyme, avec une meilleure complémentarité et en calculant l'énergie d'interaction du complexe formé. Le complexe qui aura l'énergie d'interaction la plus faible est celui qui présentera la meilleure activité et par la suite une meilleure inhibition

Les sesquiterpènes lactones sont des métabolites secondaires d'origine végétale trouvés dans plus de 15 familles avec plus de 4 000 structures connues. Ils influencent plusieurs molécules et enzymes comme l'acide phosphatase, l'arylsulfatase, la cyclooxygénase, l'ADN polymérase, le glycogène synthase, la 5-lipoxygénase, la phosphofructokinase, la phosphofructokinase, la phospholipase et thymidylate synthétase (Drew et *al.*, 2009). La bioactivité de certains sesquiterpènes lactones de *Thapsia garganica* (Makunga et *al.*, 2003) et les résultats obtenus dans cette étude nous ont encouragé à étudier certains constituants bioactifs de *T. garganica* qui pourraient être responsables de l'inhibition de la lipase.

Des expériences d'amarrage ont été menées pour prédire les orientations des liaisons de la thapsigarine, de la thapsigarginine, du tribolid, du notrilobolid et de la thapsivillosine C dans le site actif des deux lipases. Le Tableau 17 montre les résultats générés par Autodock Vina après l'analyse. Les liaisons générales entre les composés et les deux lipases (Lipase de *Candida rugosa* : CRL et lipase pancréatique humaine: LPA) sont illustrées aux Figures 38 à 44. Les distances des interactions ont été calculées à l'aide de LigPlot +.

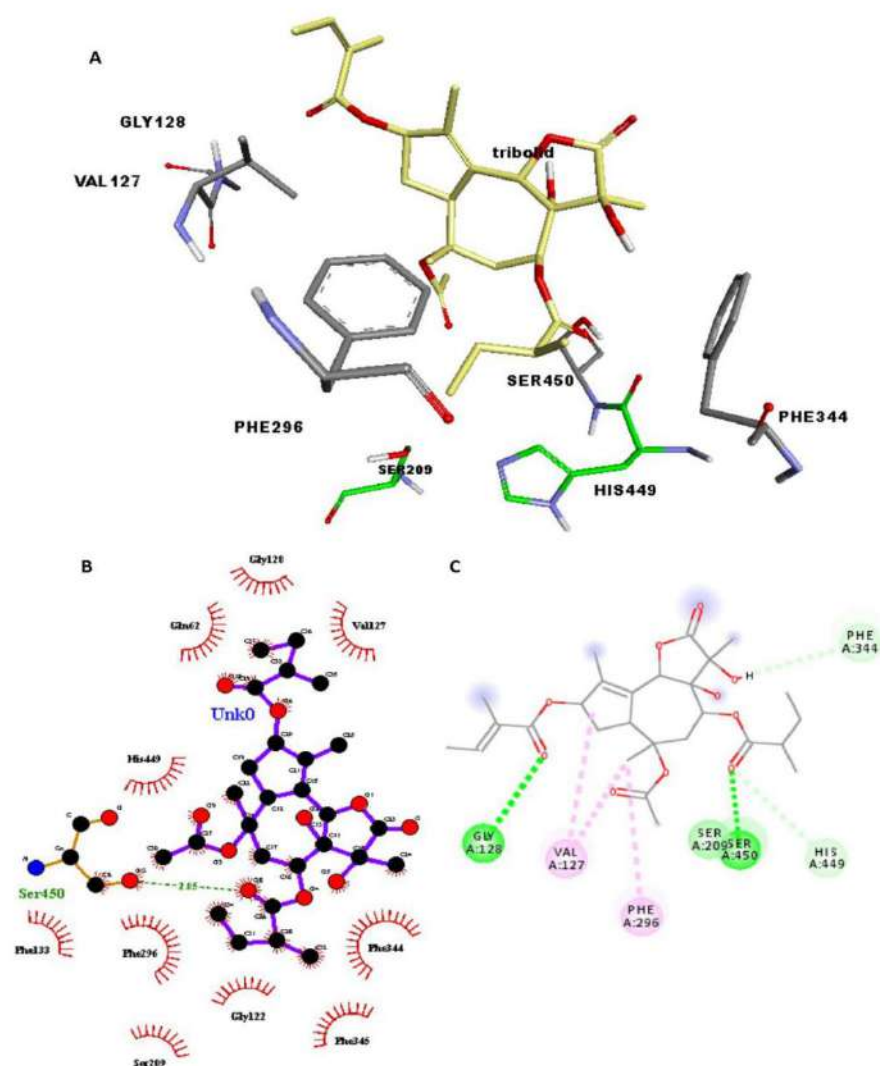
La liaison hydrogène (liaison H) fournit une contribution très importante à l'affinité de liaison pour les ligands. ainsi quatre composés parmi les cinq composés étudiés présentent une interaction de type hydrogène avec Gly128, Ser 450 ou Val 454 des CRL, et seuls deux des cinq composés étudiés présentent une interaction hydrogène avec Arg 252 de LPA.

En plus des interactions hydrophobes observées dans toutes les solutions, Tribolid a formé deux liaisons H avec les résidus Gly 128 et Ser 450 à une distance de 2,85 Å. La thapsigargin et le nortribolid montrent deux liaisons H avec la Ser 450 de CRL à des distances de 2,97 et 2,91 Å, respectivement, la Thapsigargin montre également une liaison H, mais avec le résidu Val 454 des CRL. Cependant, la thapsivillosine C n'a formé aucune liaison H, elle ne montre que des interactions hydrophobes avec les résidus Val 127, Phe 296, Phe 344, Phe 345, Phe 448, His 449 et Val 454. Les autres interactions hydrophobes formées par quatre premiers composés sont: avec Val 127, Phe 296, Phe 344, Phe 345 et His 449.



**Tableau 17:** Résultats générés par Autodock Vina après l'analyse

Molécule	Lipase de <i>Candida rugosa</i>			Lipase pancréatique humain			
	Hydrogen interactions	H-Bond length	Hydrophobic interactions	Hydrogen interactions	H-Bond length	Hydrophobic interactions	Affinity Binding Kcal/Mole
<b>Tribolid</b>	Ser 450, Gly 128	2.85	Val 127, Phe 296	Arg 256	2.86	Ile 78, Phe 77(3), Ala 259, Ala 260; His 263(2), Phe 215(2)	-6.558
<b>Thapsigargin</b>	Ser 450	2.97	Phe 345, Phe 344, His 449	-	-	-	-
<b>Nortribolid</b>	Ser 450	2.91	Val 127, Phe 296	Arg 256	2.86	Ile 78, Phe 77(3), Ala 259, Ala 260; His 263(2), Phe 215(2)	-6.618
<b>Thapsigargin</b>	Val 454	-	Phe 344, His 449	-	-	-	-
<b>Thapsivillosin C</b>	-	-	Phe 448, Val 454, Phe 296, Val 127, Phe 345, Phe 344, His 344	-	-	-	-



**Figure 38:** La meilleure solution obtenue d'amarrage de l'interaction moléculaire avec Tribolid .

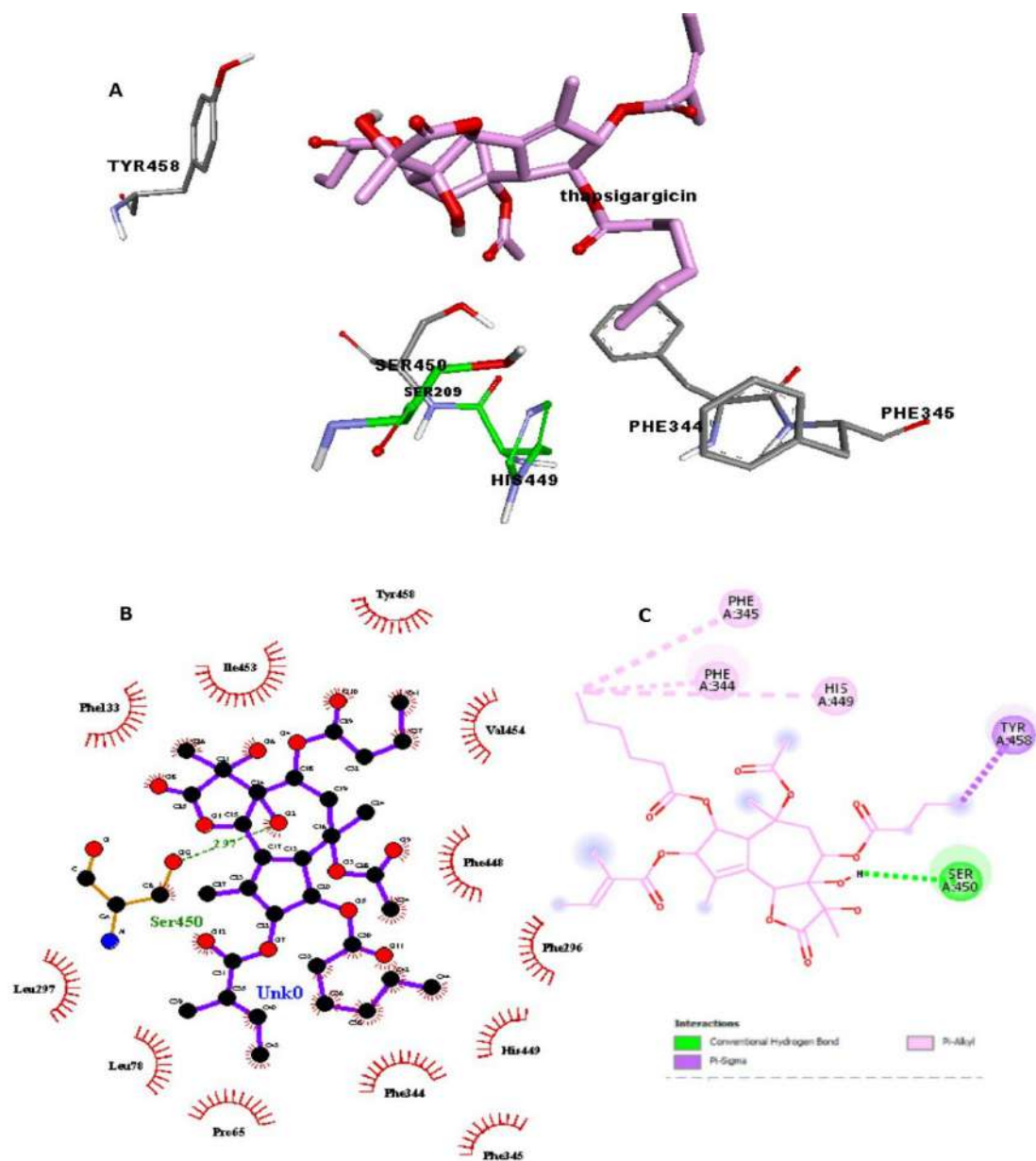


Figure 39: La meilleure solution obtenue d'amarrage de l'interaction moléculaire avec Thapsigargin.

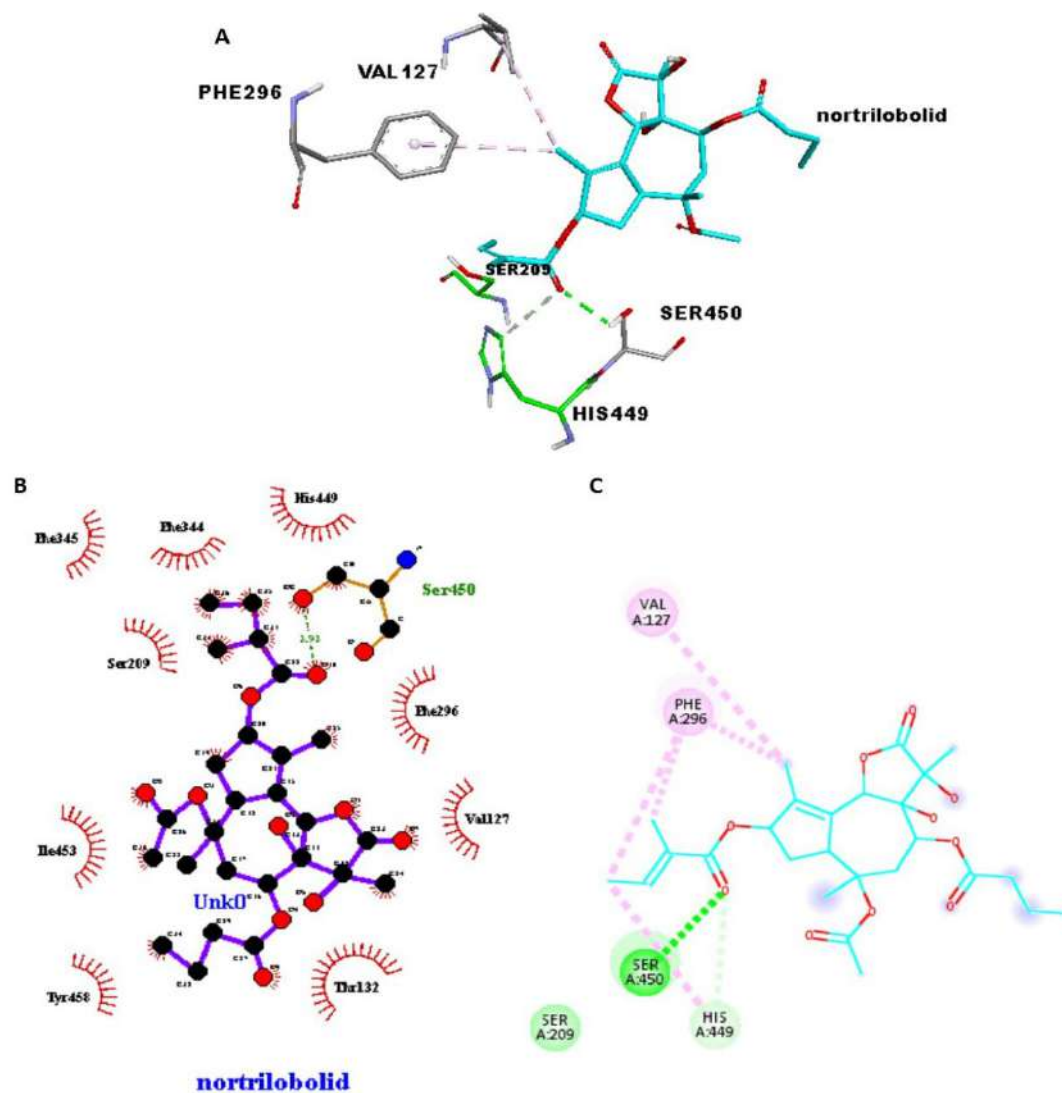
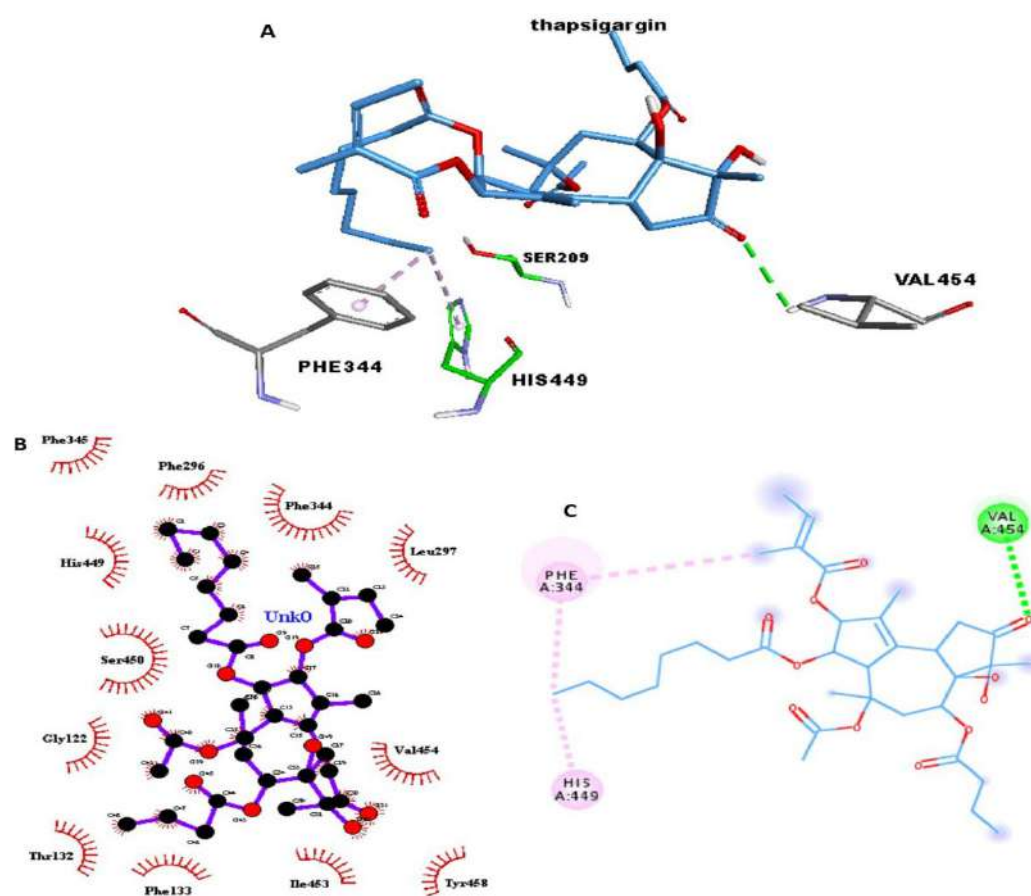
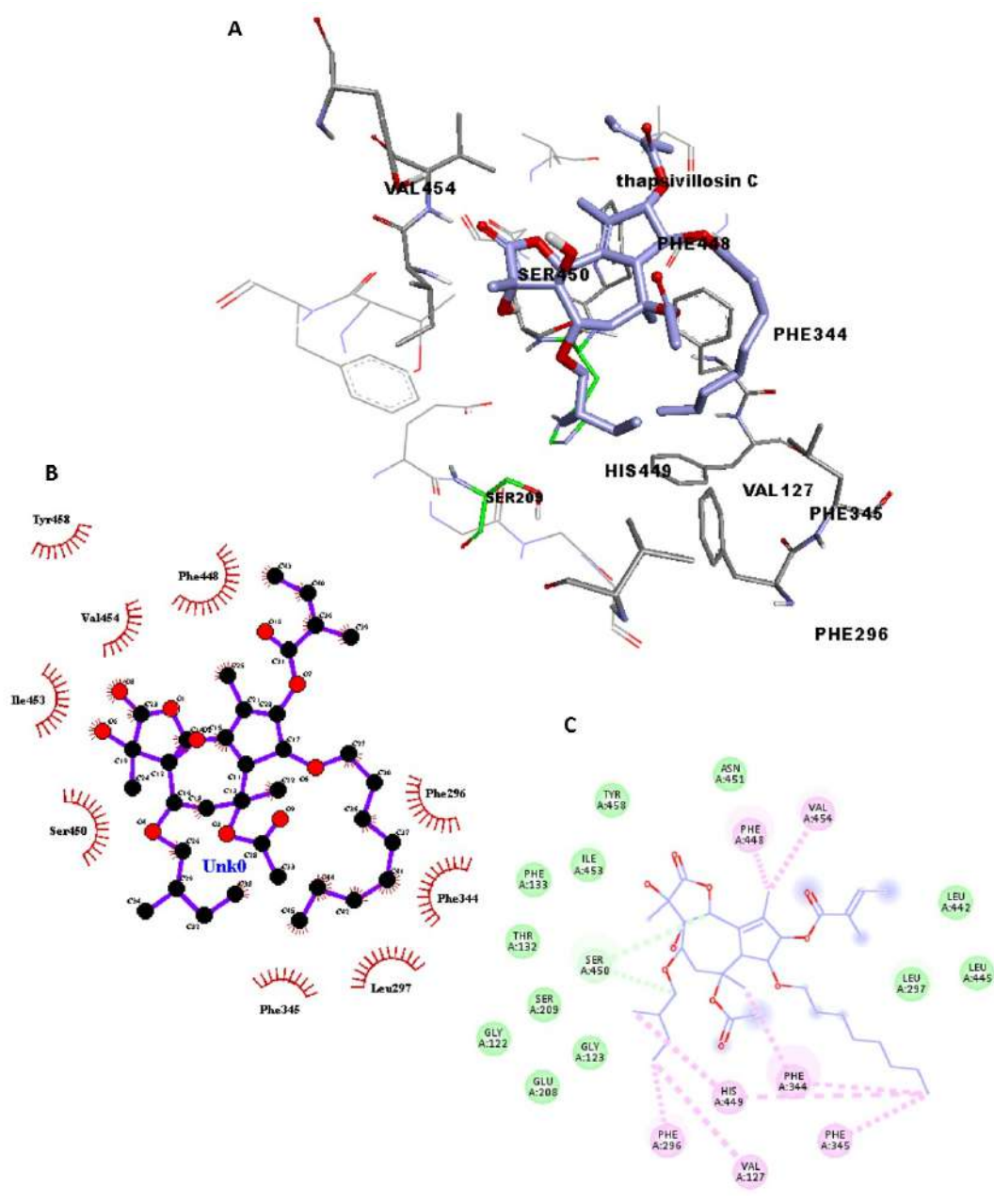


Figure 40: La meilleure solution obtenue d'amarrage de l'interaction moléculaire avec nortrilobolid.



**Figure 41:** La meilleure solution obtenue d'amarrage de l'interaction moléculaire avec Thapsigargin.



**Figure 42:** La meilleure solution obtenue d'amarrage de l'interaction moléculaire avec Thapsivillosin C.

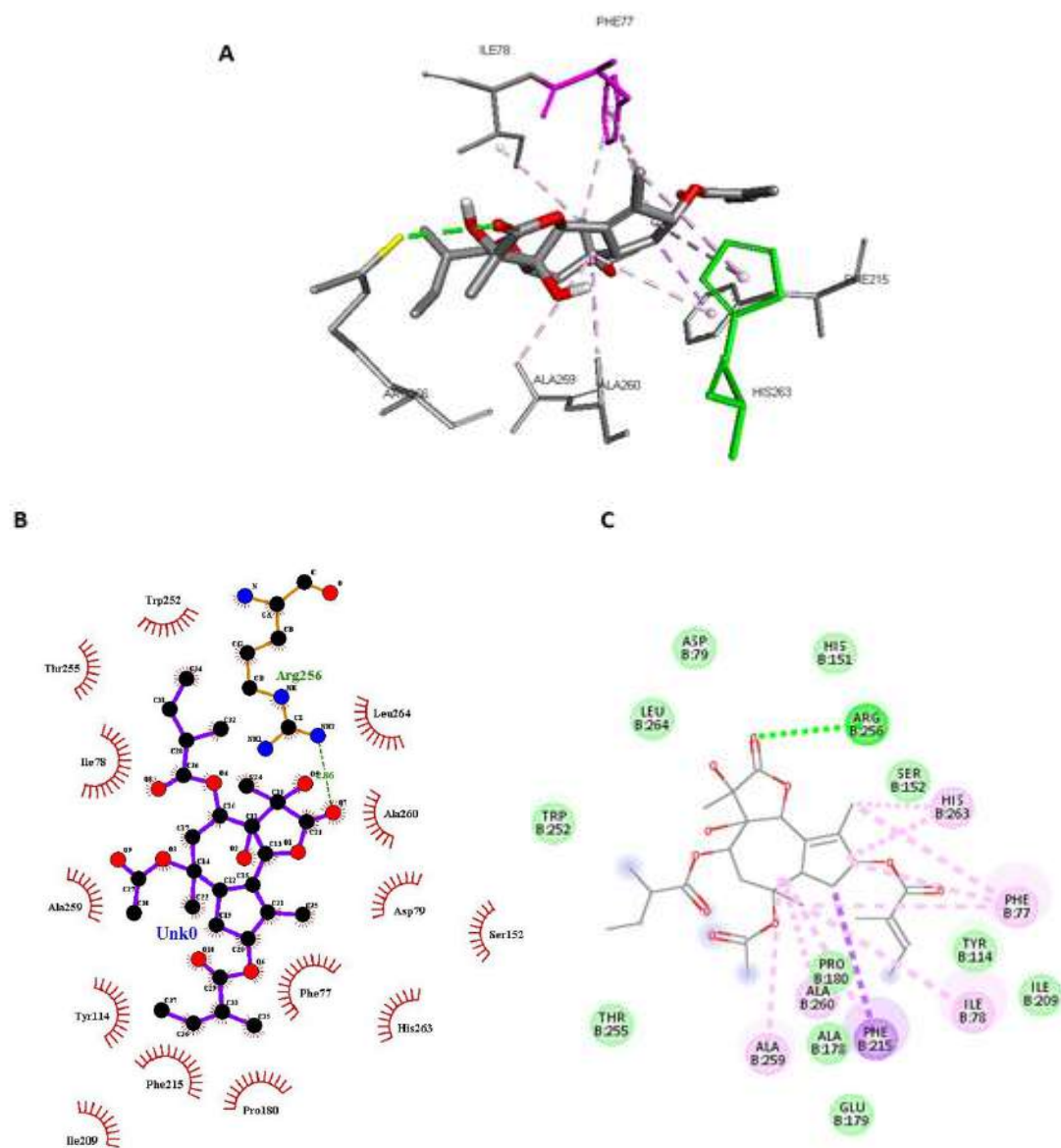
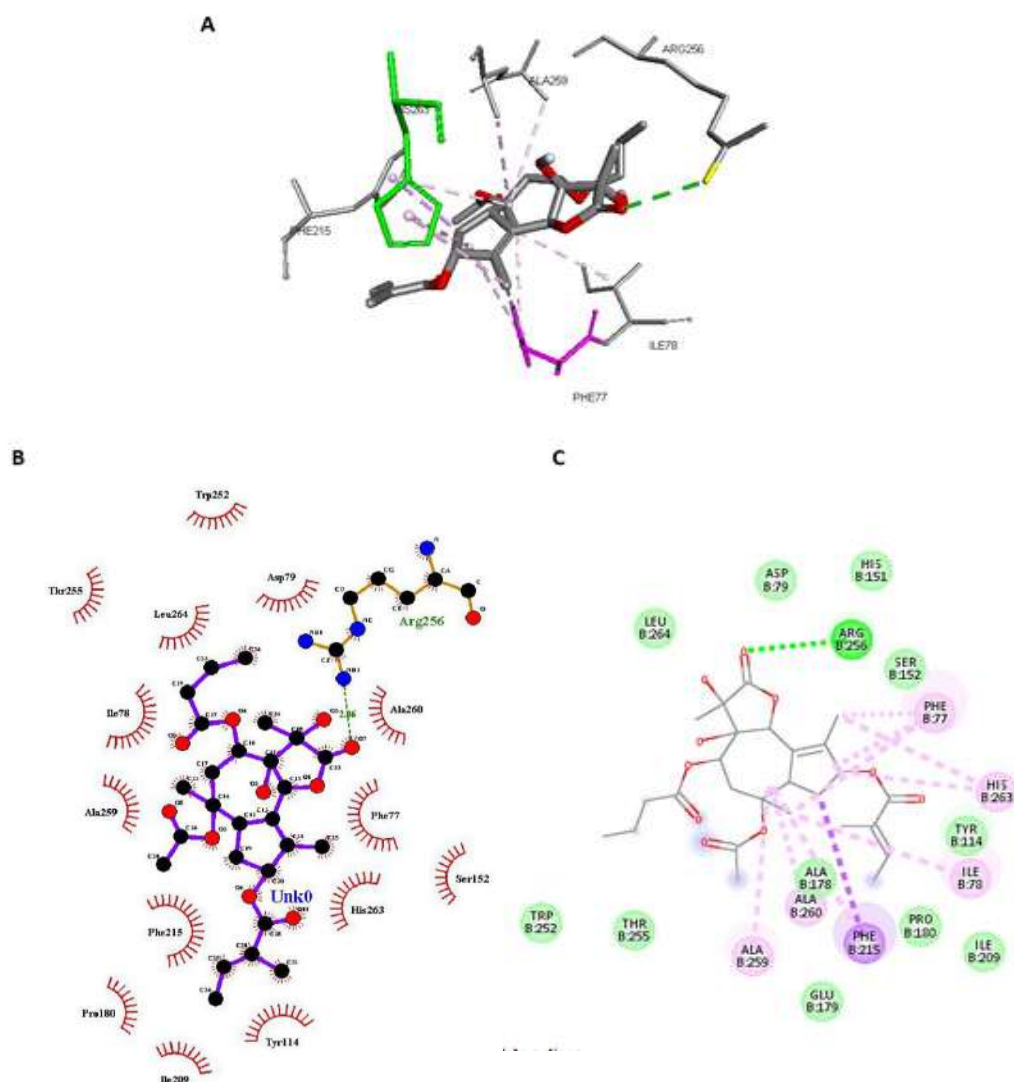


Figure 43: La meilleure solution obtenue d'amarrage de l'interaction moléculaire avec Tribolid



**Figure 44:** La meilleure solution obtenue d'amarrage de l'interaction moléculaire avec nortribolid.



## Conclusion:

Les résultats obtenus dans ce chapitre montrent que les extraits des différentes parties de *Thapsia garganica* ont un pouvoir inhibiteur important de l'activité enzymatique de la lipase, avec un effet inhibiteur plus important pour les racines. À partir de ces résultats et par rapport aux résultats de docking moléculaire, nous suggérons que nortribolid et Tribolid puissent se lier fortement au site actif, ce qui leur permet de former des liaisons covalentes entre:

- ✓ NH<sub>2</sub> d'Arg 256 et CO. Le mécanisme proposé de cette liaison est le suivant:  $\text{NH}_2 + \text{CO} \rightleftharpoons \text{NH}_2\text{CO} + \text{H} + \text{NHCO}$
- ✓ OH de Ser450 et CO. Le mécanisme de réaction proposé est le suivant:  $\text{C-OH} + \text{C-OH} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O} + \text{C} = \text{O} - \text{C}$

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BABA, Tadashi, DOWNS, Deborah, JACKSON, Kenneth W., *et al.* Structure of human milk bile salt activated lipase. *Biochemistry*, 1991, vol. 30, no 2, p. 500-510.
- BELFEKI, Hamdi, MEJRI, Mondher, et HASSOUNA, Mnasser. Antioxidant and anti-lipases activities in vitro of *Mentha viridis* and *Eucalyptus globulus* extracts. *Industrial Crops and Products*, 2016, vol. 89, p. 514-521.
- BENAROUS, K., DJERIDANE, A., KAMELI, A., *et al.* Inhibition of *Candida rugosa* lipase by secondary metabolites extracts of three Algerian plants and their antioxydant activities. *Current Enzyme Inhibition*, 2013, vol. 9, no 1, p. 75-82.
- BENAROUS, Khedidja, BOMBARDA, Isabelle, IRIEPA, Isabel, *et al.* Harmaline and hispidin from *Peganum harmala* and *Inonotus hispidus* with binding affinity to *Candida rugosa* lipase: In silico and in vitro studies. *Bioorganic chemistry*, 2015, vol. 62, p. 1-7.
- BORRELLI, Francesca et IZZO, Angelo A. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 2000, vol. 14, no 8, p. 581-591.
- BRZozowski, A. M., DEREWENDA, U., DEREWENDA, Z. S., *et al.* A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature*, 1991, vol. 351, no 6326, p. 491.
- BUSTANJI, Yasser, AL-MASRI, Ihab M., MOHAMMAD, Mohammad, *et al.* Pancreatic lipase inhibition activity of trilactone terpenes of *Ginkgo biloba*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2011, vol. 26, no 4, p. 453-459.

- DRENT, Madeleine L., *et al.* Lipase inhibition: a novel concept in the treatment of obesity. *International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity*, 1993, vol. 17, no 4, p. 241-244.
- DREW, Damian Paul, KRICHAU, Nadja, REICHWALD, Kirsten, *et al.* Guaianolides in apiaceae: perspectives on pharmacology and biosynthesis. *Phytochemistry reviews*, 2009, vol. 8, no 3, p. 581-599.
- EIJKMAN, C. Ueber Enzyme bei bakterien und Schimmelpilzen. *Cbl Bakt Parasitenk Infektionskr*, 1901, vol. 29, p. 841-8.
- EISENREICH, Wolfgang, KUPFER, Ernst, STOHLER, Peter, *et al.* Biosynthetic origin of a branched chain analogue of the lipase inhibitor, lipstatin. *Journal of medicinal chemistry*, 2003, vol. 46, no 19, p. 4209-4212.
- ERCAN, Pınar et EL, Sedef Nehir. Inhibitory effects of chickpea and *Tribulus terrestris* on lipase,  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. *Food chemistry*, 2016, vol. 205, p. 163-169.
- FICKERS, Patrick, DESTAIN, Jacqueline, et THONART, Philippe. Les lipases sont des hydrolases atypiques: principales caractéristiques et applications. *Biotechnologie, agronomie, société et environnement*, 2008, vol. 12, no 2, p. 119-130.
- FRANCO, Rodrigo Rodrigues, DA SILVA CARVALHO, Danúbia, DE MOURA, Francielle Borges Rosa, *et al.* Antioxidant and anti-glycation capacities of some medicinal plants and their potential inhibitory against digestive enzymes related to type 2 diabetes mellitus. *Journal of ethnopharmacology*, 2018, vol. 215, p. 140-146.
- GRIPPA, Eleonora, VALLA, Roberto, BATTINELLI, Lucia, *et al.* Inhibition of *Candida rugosa* lipase by berberine and structurally related alkaloids, evaluated by high-performance liquid chromatography. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 1999, vol. 63, no 9, p. 1557-1562.
- HAUPTMAN, J. B., JEUNET, Francis S., et HARTMANN, Dieter. Initial studies in humans with the novel gastrointestinal lipase inhibitor Ro 18-0647 (tetrahydrolipstatin). 1992.
- HIGAKI, Shuichi. Lipase inhibitors for the treatment of acne. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2003, vol. 22, no 5-6, p. 377-384.
- JAEGER, Karl-Erich et EGGERT, Thorsten. Lipases for biotechnology. *Current opinion in biotechnology*, 2002, vol. 13, no 4, p. 390-397.
- JAEGER, Karl-Erich et REETZ, Manfred T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in biotechnology*, 1998, vol. 16, no 9, p. 396-403.
- KLIBANOV, Alexander M. Improving enzymes by using them in organic solvents. *nature*, 2001, vol. 409, no 6817, p. 241.
- MAKUNGA, N. P., JÄGER, A. K., et VAN STADEN, J. Micropropagation of *Thapsia garganica*—a medicinal plant. *Plant Cell Reports*, 2003, vol. 21, no 10, p. 967-973.
- MILED, N., BEISSON, F., DE CARO, J., *et al.* Interfacial catalysis by lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2001, vol. 11, no 4-6, p. 165-171.
- MOON, Seo Hyun et KIM, Min Young. Phytochemical profile, antioxidant, antimicrobial and antipancreatic lipase activities of fermented *Camellia japonica* L leaf extracts. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2018, vol. 17, no 5, p. 905-912.

- MÜLLER, Günter et PETRY, Stefan (ed.). *Lipases and phospholipases in drug development: from biochemistry to molecular pharmacology*. John Wiley & Sons, 2004.
- OLLIS, David L., CHEAH, Eong, CYGLER, Miroslaw, *et al.* The  $\alpha/\beta$  hydrolase fold. *Protein Engineering, Design and Selection*, 1992, vol. 5, no 3, p. 197-211.
- PALOMO, José M., PEÑAS, María M., FERNÁNDEZ-LORENTE, Gloria, *et al.* Solid-phase handling of hydrophobins: immobilized hydrophobins as a new tool to study lipases. *Biomacromolecules*, 2003, vol. 4, no 2, p. 204-210.
- PATIL, Samadhan G., PATIL, Mohini P., MAHESHWARI, Vijay L., *et al.* In vitro lipase inhibitory effect and kinetic properties of di-terpenoid fraction from *Calotropis procera* (Aiton). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2015, vol. 4, no 4, p. 579-585.
- PEREIRA, Mariana Nunes, JUSTINO, Allisson Benatti, MARTINS, Mário Machado, *et al.* Stephalagine, an alkaloid with pancreatic lipase inhibitory activity isolated from the fruit peel of *Annona crassiflora* Mart. *Industrial crops and products*, 2017, vol. 97, p. 324-329.
- REETZ, Manfred T., ZONTA, Albin, et SIMPELKAMP, Jörg. Efficient immobilization of lipases by entrapment in hydrophobic sol-gel materials. *Biotechnology and Bioengineering*, 1996, vol. 49, no 5, p. 527-534.
- REIS, Pedro, HOLMBERG, Krister, WATZKE, Heribert, *et al.* Lipases at interfaces: a review. *Advances in colloid and interface science*, 2009, vol. 147, p. 237-250.
- SHIMURA, Susumu, TSUZUKI, Wakako, KOBAYASHI, Shoichi, *et al.* Inhibitory effect on lipase activity of extracts from medicinal herbs. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 1992, vol. 56, no 9, p. 1478-1479.
- SINGH, Birbal, BHAT, Tej K., et SINGH, Bhupinder. Potential therapeutic applications of some antinutritional plant secondary metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, vol. 51, no 19, p. 5579-5597.
- SLOMIANY, B. L., MURTY, V. L. N., PIOTROWSKI, J., *et al.* Gastroprotective agents in mucosal defense against *Helicobacter pylori*. *General Pharmacology: The Vascular System*, 1994, vol. 25, no 5, p. 833-841.
- STITZIEL, Nathan O. Human genetic insights into lipoproteins and risk of cardiometabolic disease. *Current opinion in lipidology*, 2017, vol. 28, no 2, p. 113.
- UNUOFIN, Jeremiah Oshiomame, OTUNOLA, Gloria Aderonke, et AFOLAYAN, Anthony Jide. In vitro  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, lipase inhibitory and cytotoxic activities of tuber extracts of *Kedrostis africana* (L.) Cogn. *Heliyon*, 2018, vol. 4, no 9, p. e00810.

# *Conclusion générale*

*Thapsia garganica* L. (Apiaceae) est l'une des plantes médicinales importantes, elle a fait l'objet de plusieurs recherches scientifiques en raison de ses caractéristiques biologiques telles que ses propriétés antioxydantes, antifongiques, anti-inflammatoires, cytotoxiques, anticancéreuses.

Le présent travail a pour objectif de caractériser les graines, les feuilles et les racines de *Thapsia garganica* provenant de la région de Tadjmoute (wilaya de Laghouat) à travers l'étude de quelques activités de ses extraits polaires et apolaires (lipidiques)

L'étude des huiles de *Thapsia garganica* a permis de détecter la présence de l'acide pétrosélinique, un isomère de l'acide oléique. Ces huiles sont caractérisées par différents profils en acides gras avec des proportions importantes en acides gras insaturés.

L'étude des huiles des différentes parties de *Thapsia garganica* montre la richesse en insaponifiables (tocophérols et en stérols) dans les huiles des feuilles et des racines par rapport aux graines.

Une évaluation de l'effet de la polarité des solvants sur la teneur en composés phénoliques est étudiée en réalisant des extractions successives par DCM, Ac-O-Et, et le MeOH. Les résultats trouvés montrent une différence significative entre le pouvoir extracteur de ces solvants ainsi qu'une différence entre les teneurs en composés phénoliques entre les différentes parties de la plante.

Sur la base de cette étude, nous pouvons conclure que le système d'extraction utilisé dans ce travail nous a permis de déterminer le méthanol comme un bon solvant pour extraire les métabolites secondaires des graines, racines et feuilles de *Thapsia garganica*, de sorte que les extraits obtenus par ce solvant ont les meilleurs rendements et les meilleures activités antioxydantes comparativement aux autres solvants.

L'étude de l'activité antioxydante des huiles et des insaponifiables de *Thapsia garganica* montre une très forte activité des huiles et des insaponifiables de racines et de feuilles par rapport aux graines.

L'activité inhibitrice des extraits d'acétate d'éthyle des graines, feuilles et racines, de *Thapsia garganica* contre la lipase de *Candida rugosa* a été étudiée et les valeurs de IC<sub>50</sub> obtenus sont: 1,19 mg / ml, 1,96 mg / ml et 1,87 mg / ml, respectivement. Ce qui révèle une activité puissante de ces extraits spécialement les racines.

Pour découvrir les composants actifs responsables de cette activité anti-lipase, des recherches supplémentaires ont été effectuées en utilisant des simulations d'amarrage, en utilisant le programme AutoDock Vina pour discuter la nature des interactions et le mécanisme d'inhibition par les principaux composés bioactifs synthétisés par cette plante. Les résultats montrent que le nortribolid et le tribolid sont les meilleurs inhibiteurs des deux lipases (*Candida rugosa* et lipases pancréatiques humaines).

À notre connaissance, c'est pour la première fois qu'une étude phytochimique concernant la composition en acide gras, tocophérols, l'activité antioxydante, inhibition de lipase a été menée sur les graines, les feuilles et les racines de *Thapsia garganica*. Les résultats obtenus servent donc à mieux connaître cette espèce, et nous encourageant à la choisir comme une source pour d'autres études plus approfondies.

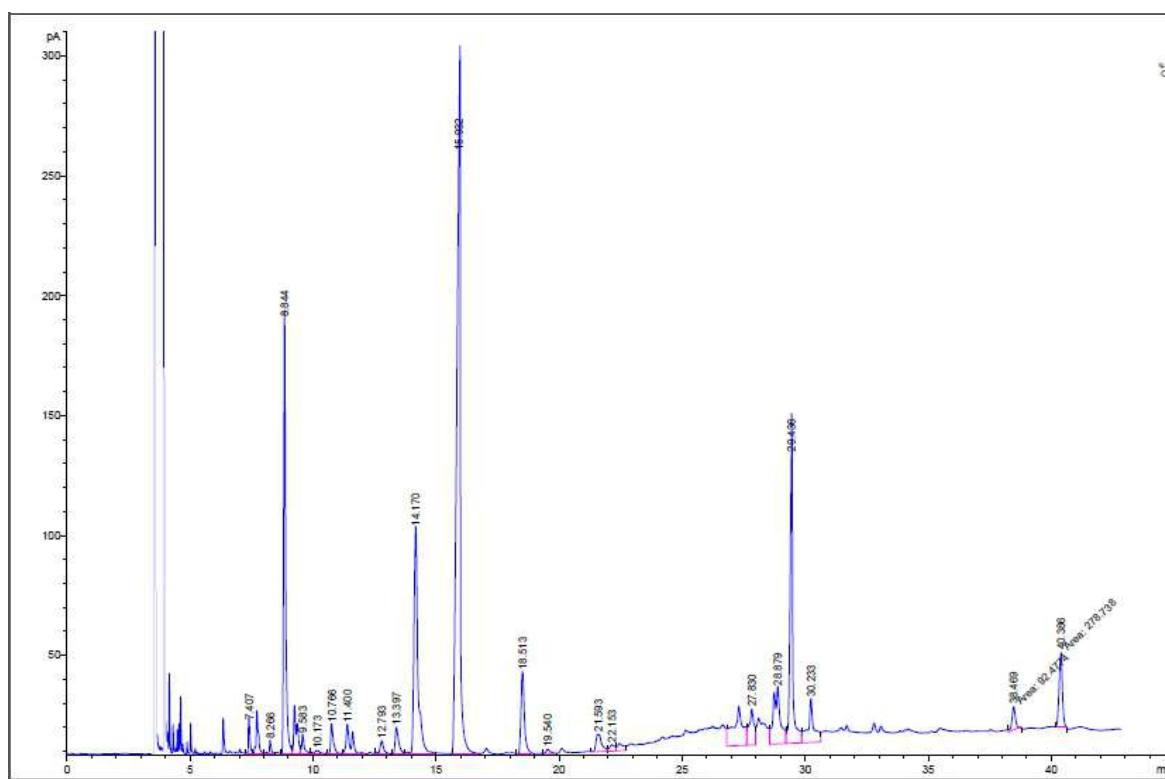
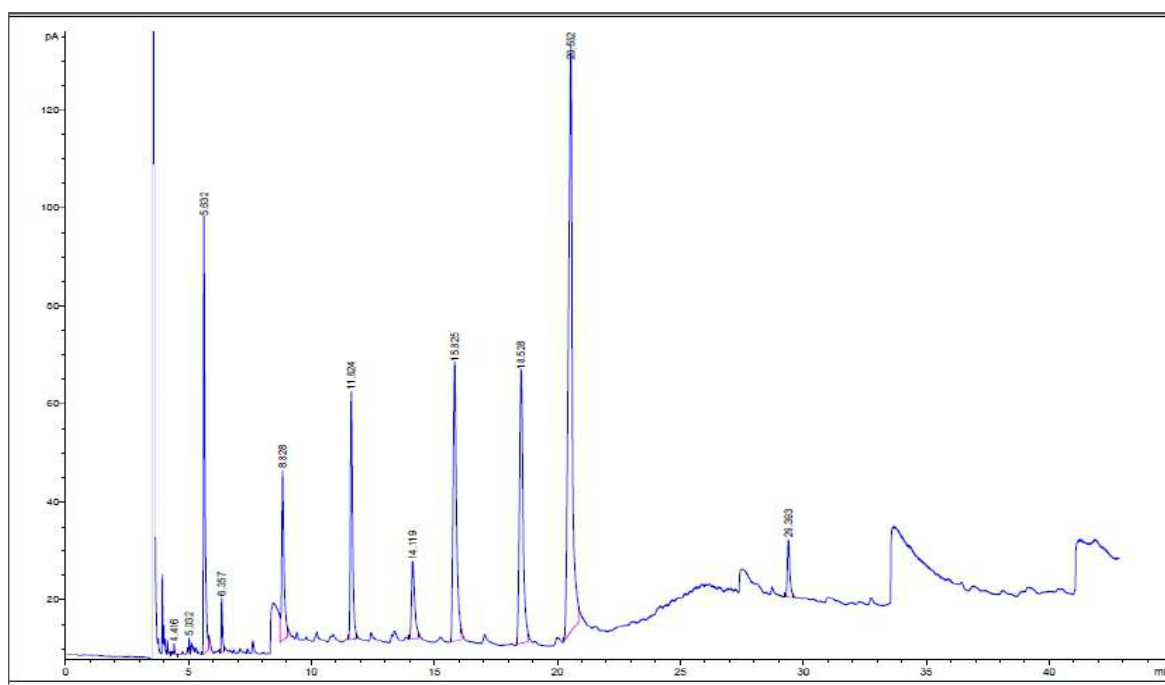
À l'issue de ces travaux menés tout au long de cette thèse, un certain nombre de pistes de recherche sont à notre portée et méritent d'être expérimentées. En voici quelques-unes :

- ✓ L'analyse approfondie et détaillée des insaponifiables des huiles de *Thapsia garganica* sera intéressante
- ✓ Analyser la composition des extraits polaires.
- ✓ Valorisation des extraits obtenus par d'autres tests biologiques telles que l'activité anticancéreuse et antibactériennes.
- ✓ Approfondir l'analyse des tests enzymatiques afin de prouver les mécanismes suggérés.

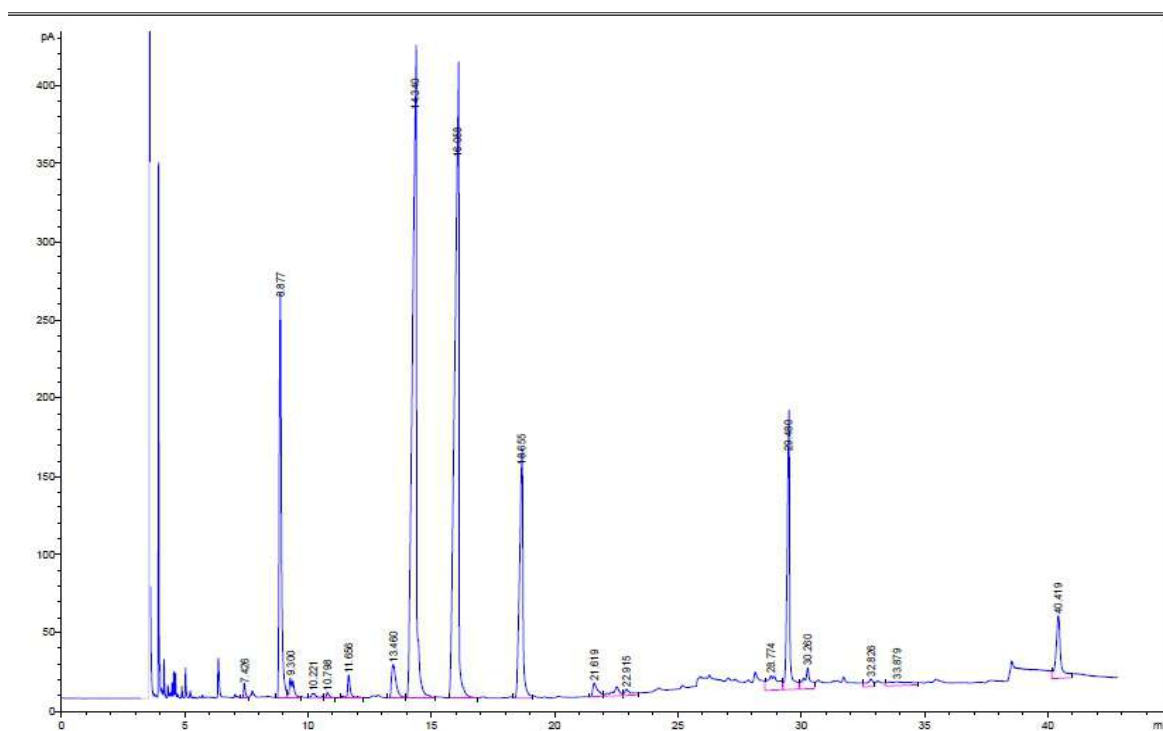
# *Annexes*

---

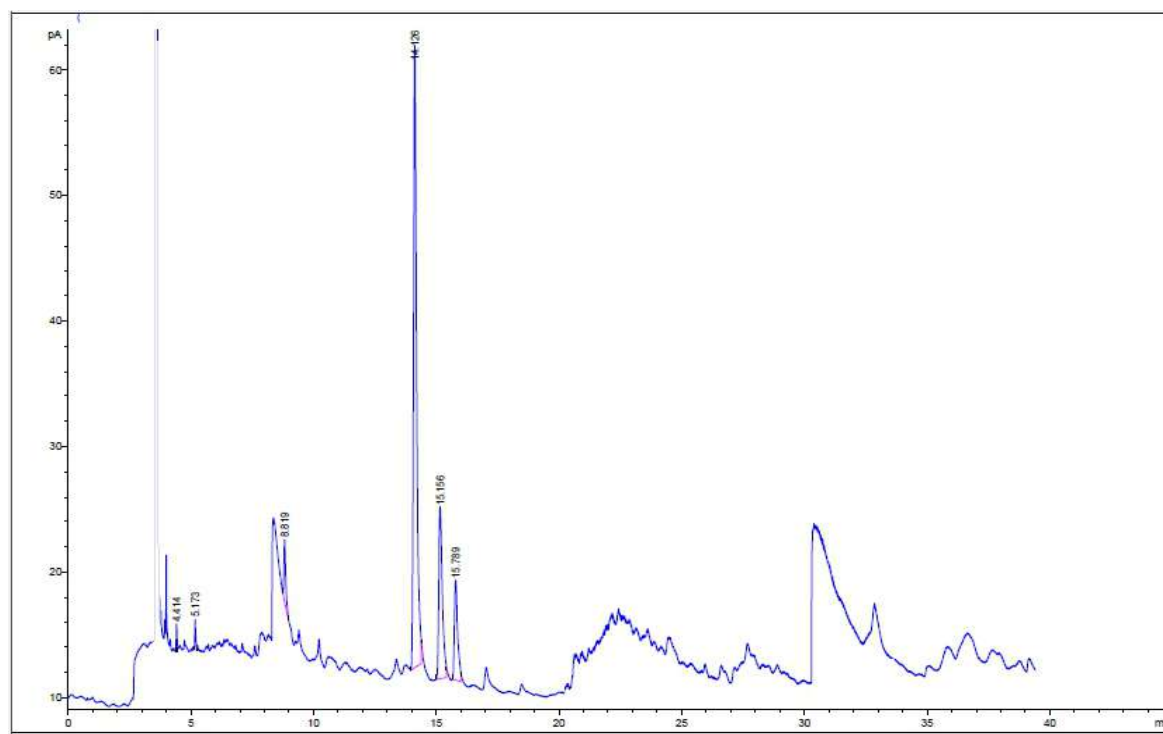
## Annexel: Chromatogramme des EMAG des lipides

Chromatogramme des EMAG des lipides des racines de *Thapsia garganica*Chromatogramme des EMAG des lipides des feuilles de *Thapsia garganica*



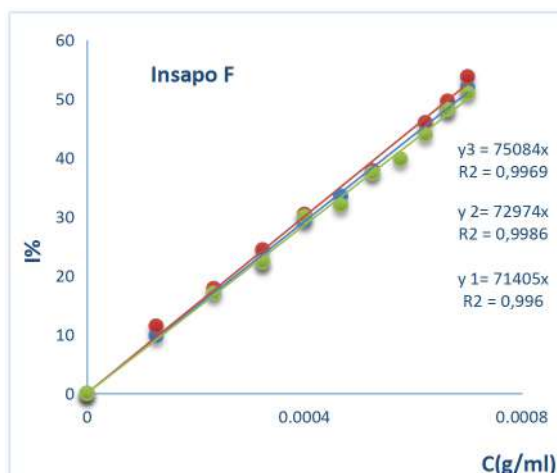
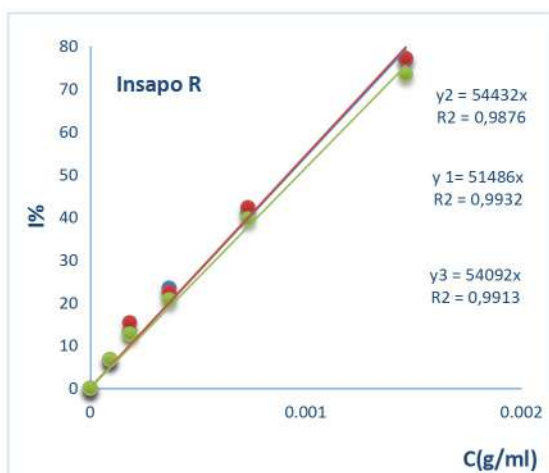
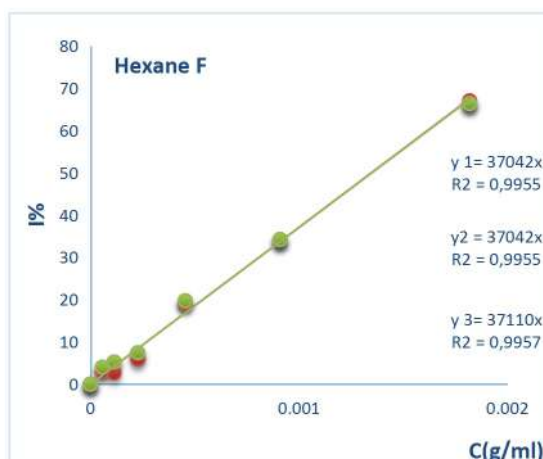
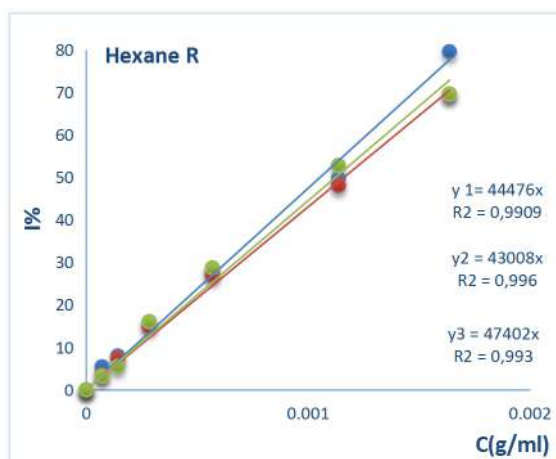
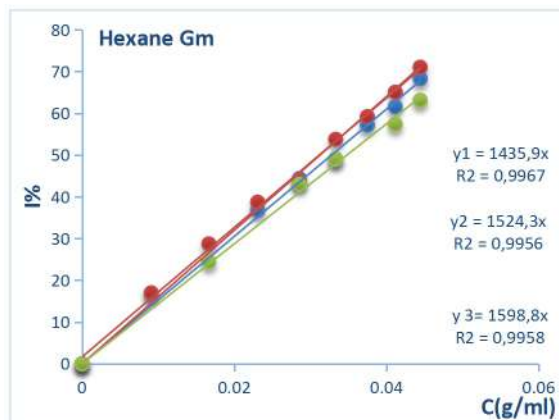
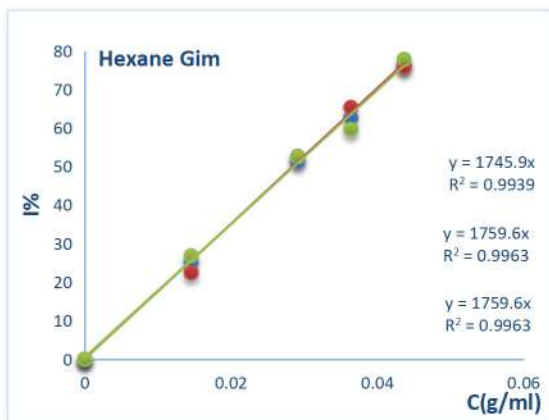


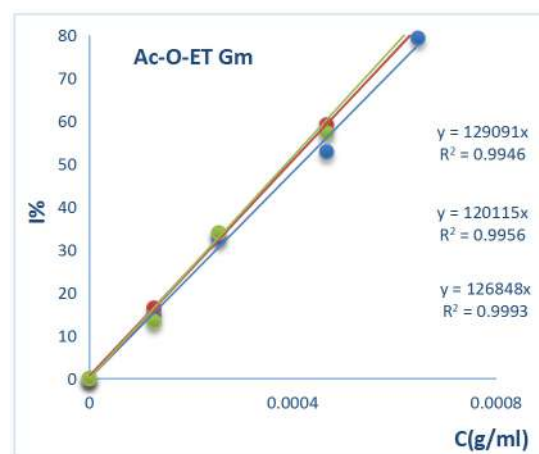
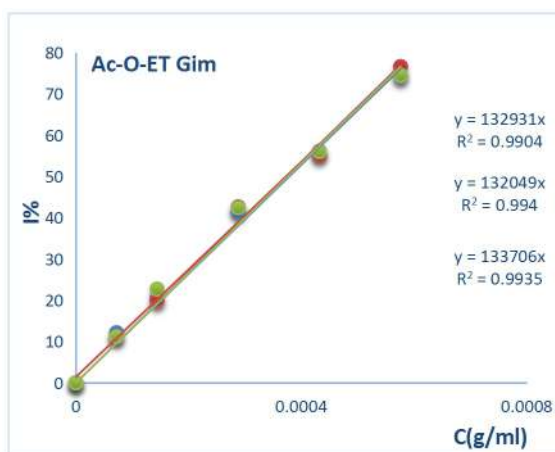
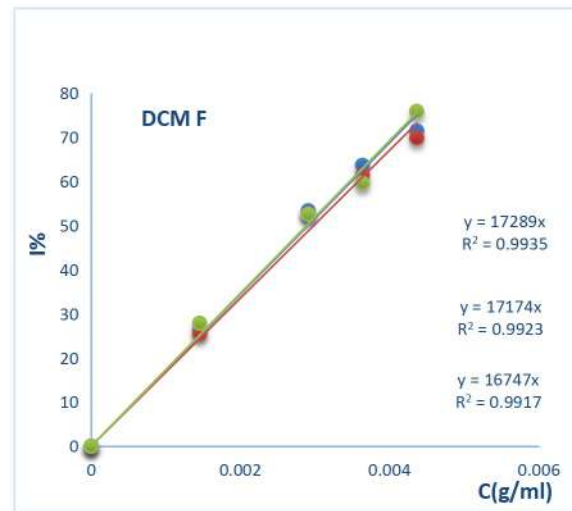
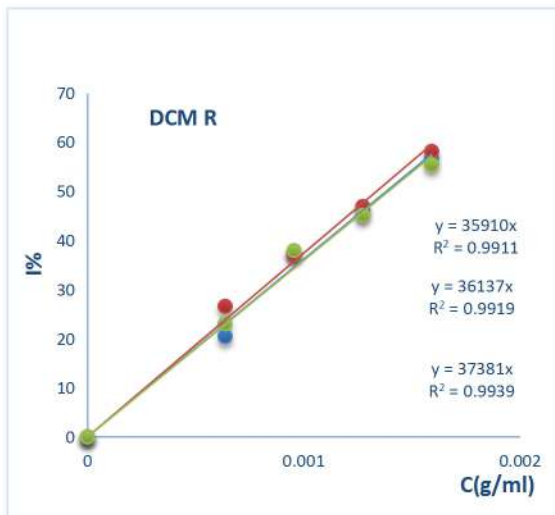
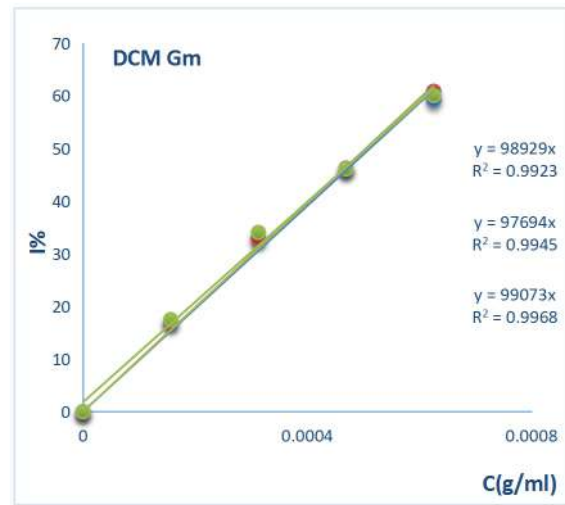
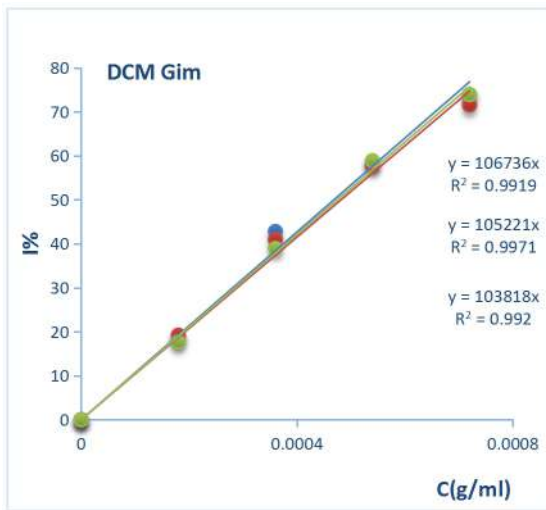
Chromatogramme des EMAG des lipides des graines immatures de *Thapsia garganica*

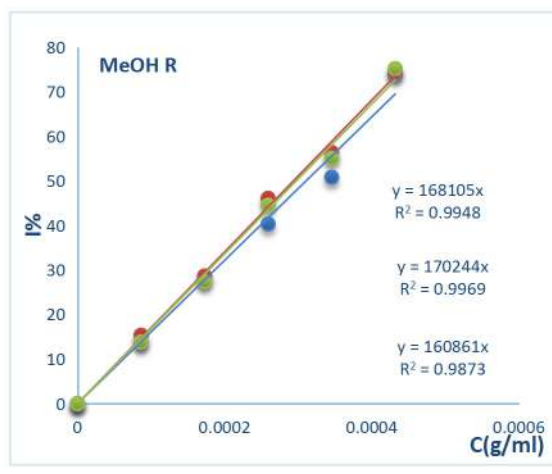
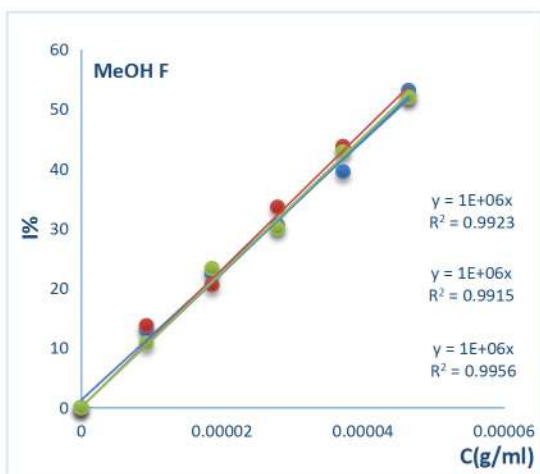
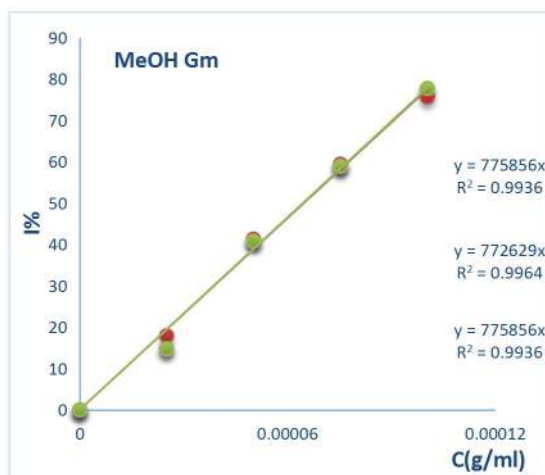
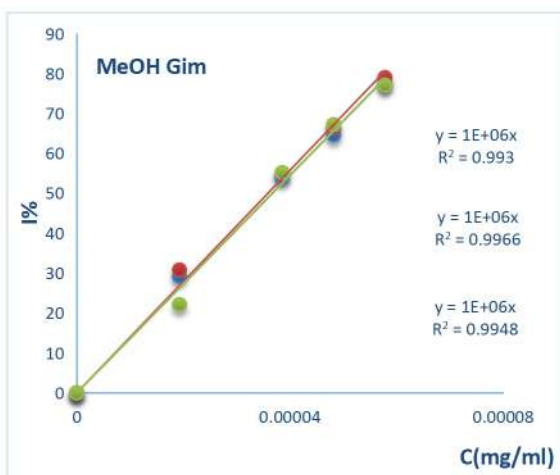
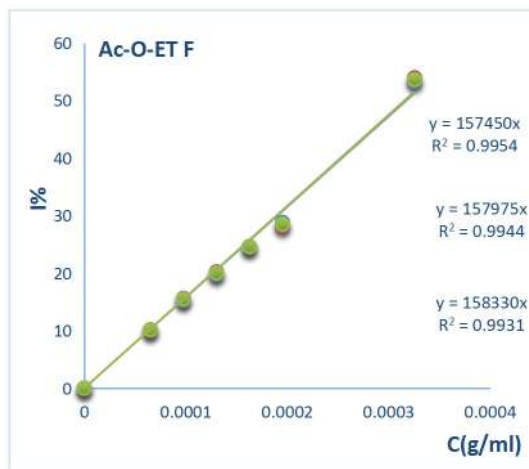
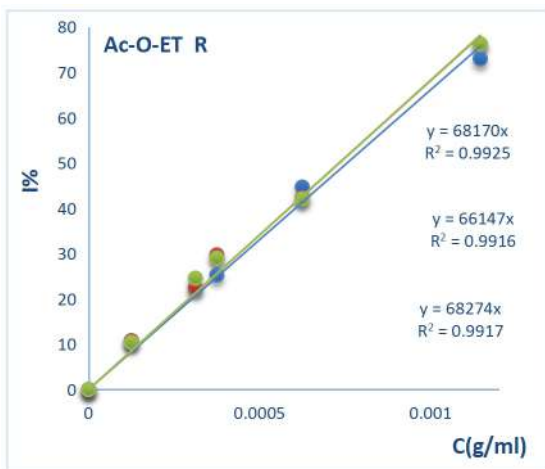


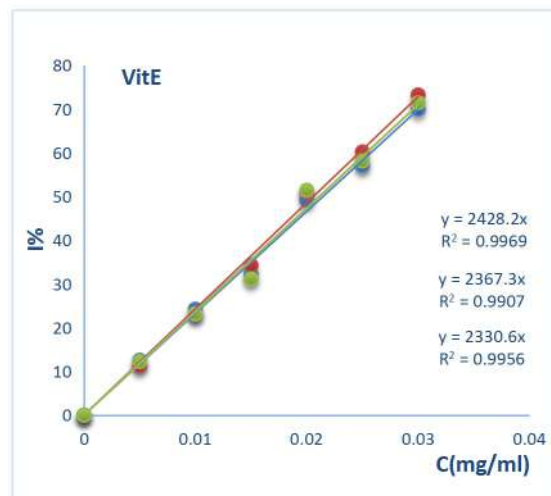
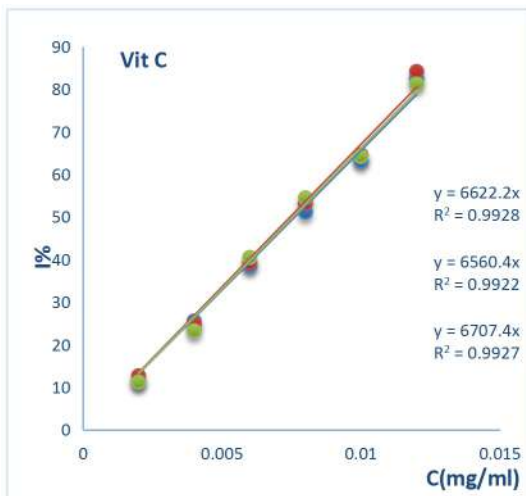
Chromatogramme des EMAG des lipides des graines matures de *Thapsia garganica*

**Annexe2:** Les courbes de variation du pourcentage d'inhibition (I% ) en fonction de la concentration de chaque extrait.(Test DPPH)









**Annexe3:** Les courbes de variation du pourcentage d'inhibition (I% ) en fonction de la concentration de chaque extrait (Test FRAP)

