

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة – الحراش – الجزائر –

Ecole Nationale Supérieure Agronomique, ENSA

Département de Technologie Alimentaire



THÈSE

Présentée pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT

En Sciences Agronomiques

Option : *Sciences et qualité des aliments*

Par

Mlle. MOHAMED MOHAMED IBRAHIM Abir

Thème

**Effet de différentes irradiations électromagnétiques sur
l'aspect qualitatif et quantitatif des substances chimiques
extraites à partir de *Thapsia garganica L.***

Soutenue publiquement le 26/06/2018

devant le jury composé de :

Mr BENCHABANE Ahmed	Professeur	ENSA	Président
Mr BENKACI-ALI Farid	Professeur	USTHB	Directeur de thèse
Mme FERHAT Zoulikha	Professeur	ENSA	Co-directrice
Mr HAZZIT Mohamed	Professeur	ENSA	Examineur
Mr NASRALLAH Noureddine	Professeur	USTHB	Examineur
Mr DAHMANE Mohamed	MCA	USTHB	Examineur

Année universitaire 2017-2018

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Allah le tout puissant et miséricordieux, qui m'a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.

Je tiens à saisir cette occasion et adresser mes profonds remerciements et mes profondes reconnaissances à M. Benkaci-Ali mon encadreur de mémoire de fin d'étude, pour l'orientation, la confiance, la patience qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené à bon port. Qu'il trouve dans ce travail un hommage vivant à sa haute personnalité.

En second lieu, je remercie ma co-promotrice Mm. Feraht pour ces précieux conseils et son aide tout au long de ma recherche et durant la période du travail.

Je ne manquerais pas non plus de dire un grand merci aux membres du jury, M. Nasrallah et M. Dahmane qui ont accepté, sans réserve aucune, d'évaluer cette thèse à sa juste valeur, et de me faire part de leur remarques sûrement pertinentes qui, avec un peu de recul, contribueront, sans nul doute, au perfectionnement du présent travail.

Je saisis aussi cette occasion pour prononcer un mot de gratitude à l'égard du Professeur M. Hazzit pour ses qualités scientifiques, pédagogiques, mais surtout humaines, pour ses conseils et son intérêt incontestable qu'il porte à tous les étudiants. Merci d'avoir guidé mes premiers pas dans le chemin de la recherche. Je veux vraiment vous remercier car j'ai eu beaucoup de chance de vous avoir comme enseignant et encadreur durant mon cursus.

Un remerciement particulier à M. Benchabane pour son encouragement, patience et confiance manifestée ; vous étiez un support pour moi.

Je remercie sincèrement M. Henrik qui, en tant que Directeur de mon stage, s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation du stage, aussi pour l'accueil, l'inspiration, l'aide et le temps qu'il a bien voulu me consacrer et sans qui ce mémoire n'aurait jamais débuté. Ainsi l'ensemble du personnel du Département des Sciences Végétales et Environnementales, de la Faculté des sciences à l'Université de Copenhague en particulier Karen, pour leur patience, leurs conseils pleins de sens et pour le suivi et l'intérêt qu'ils ont portés à mes travaux.

Mes remerciements s'étendent également à M. Yefsah, Chercheur au Centre de Recherche Nucléaire d'Alger, pour ses bonnes explications et sa collaboration dans l'accomplissement de ce modeste travail.

Qu'il me soit permis de remercier toute ma famille et mes amis pour leur amour, leurs prières leurs encouragements et leur soutien constant. Je leur dédie cette thèse.

Aussi bien les membres du staff de la FAO, à qui je présente mes sincères remerciements pour les opportunités qu'ils m'ont assurées, pour leur amitié et encouragement, vous êtes une deuxième famille. Merci.

Je n'oublie bien évidemment pas mes camarades de formation et les remercie chaleureusement pour tous les agréables moments passés ensemble, notamment ma très chère Zahia, vos encouragements, étaient la bouffée d'oxygène qui me ressourçait dans les moments pénibles, de solitude et de souffrance, où l'on a terriblement besoin d'un petit mot, d'un petit geste, aussi humble soit-il, de soutien moral.

En guise de reconnaissance, je tiens à témoigner mes sincères remerciements à toutes les personnes qui de près ou de loin, ont permis et contribuées par leurs conseils et leurs compétences à la réalisation de ce mémoire.

Enfin, je n'oserais oublier de remercier tout le corps professoral de l'École Nationale Supérieure Agronomique, pour le travail énorme qu'il effectue pour moi, surtout aux personnels de la bibliothèque centrale de l'école notamment Mohamed, qui n'ont cessé de créer les conditions les plus favorables pour mes recherches.

Liste des abréviations

μ -SPME : Microextraction en phase solide membranaire	FPP: Farnésyl diphosphate
4HR : 4-hexylresorcinol	G202: Pro-drogue
ABTS : Acide 2,2'-azino-bis (3-éthyl benzothiazoline-6-sulfonique)	GC : Chromatographie en phase gazeuse
ADN : Acide désoxyribonucléique	HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance
AIEA: Agence internationale de l'énergie atomique	KGy : Kilo Gray (unité de mesure des rayons gamma)
B : Champ magnétique	MC : Macération classique
BCG : Broyage Cryogénique	MS : Spectrométrie de masse
BCL : Broyage classique	Nb : Notrilobolide
BHT : Butylhydroxytoluène	NMR (HPLC-SPE-NMR: Chromatographie en phase liquide à haute performance - extraction en phase solide - résonance magnétique nucléaire
CAR : Carboxen	OMS : Organisation mondiale de la santé
CCM: Chromatographie en couche mince	ONU : Organisation des Nations unies
COV : Composés organiques volatils	PDMS : Polydiméthyl siloxane
CRNA: Centre de Recherche Nucléaires d'Alger	PDMS/DVB : Poly (diméthylsiloxane)/divinylbenzène
DL : Dose Létale	RE: Réticulum Endoplasmique
DPPH : 2,2-diphényl-2-picrylhydrazyle	SE: Simple Extraction
DVB : Divinylbenzène	SERCA : réticulum sarco-endoplasmique Ca^{2+} -ATPase
E : Champ électrique	SPME : Microextraction en phase solide
EAM : Extraction assistée par micro-ondes	STL : Sesquiterpènes Lactones
EAS : Extraction accélérée de solvant	TBHQ : Tertiobutylhydroquinone
EAU : Extraction assistée par ultrasons	Tc : Thapsigarcine
EBF : Extrait de feuilles de Bejaïa	TE : Transverse électrique
EBR : Extrait racinaire de Bejaïa	Tg : Thapsigargine
EESC : Extraction d'eau sous-critique	TgTPS2: Terpène synthase
ELP : Extraction liquide pressurisée	TIS : Technique des Insectes Stériles
EMBF : Extrait méthanolique des feuilles de Bejaïa	TM : Transverse magnétique
EMBR : Extrait méthanolique des racines de Bejaïa	URSS : Union des républiques socialistes soviétiques
EMF : Extrait de feuilles de Médéa	UV : Ultra-Violet
EMMF : Extrait méthanolique des feuilles de Médéa	
EMMR : Extrait méthanolique des racines de Médéa	
EMR : Extrait racinaire de Médéa	
ENL : Extraction classique en utilisant l'azote liquide pour le broyage	
FAO : Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture	
FID : Détection d'ionisation de flamme	

Liste des figures et des schémas

Figure 1 : Chimie verte durable.....	3
Figure 2 : Principes de la chimie verte et de l'extraction verte.....	5
Figure 3 : Logo caractérisant les aliments traités par ionisations.....	10
Figure 4 : Eléments d'un four microonde.....	17
Figure 5 : Illustration du chauffage micro-onde.....	18
Figure 6 : Action du champ électrique.....	19
Figure 7 : Structure du principe actif : thapsigargine (Tg).....	25
Figure 8 : Famille des thapsigargines.....	26
Figure 9 : Thapsigargine et ses pro-drogues.....	27
Figure 11 : Présentation de la plante <i>Thapsia garganica</i> L.....	33
Figure 12 : Description des fleurs en ombelles de <i>T.garganica</i> L.	34
Figure 13 : Description des feuilles de <i>T.garganica</i> L.....	34
Figure 14 : Description des graines de <i>T.garganica</i> L. après sa maturation (mois juillet-Août)	35
Figure 15 : Description du dispositif SPME adaptable au chromatographe en phase gazeuse et chromatographe en phase gazeuse couplé au spectromètre de masse.....	41
Figure 16 : Présentation de l'extraction par SPME en mode immersion direct (DI-immersion)	41
Figure 17 : (1) Photo de <i>T.garganica</i> prise lors du prélèvement dans la région de Sidi-Aich, Béjaia ; (2) : Photo de <i>T.garganica</i> prise lors du prélèvement dans la région d'Ain-Boussif, Médéa ; (A) : Agrandissement de la partie terrestre racines et feuilles.....	47
Figure 18 : Structure des standards cherchés et quantifiés dans notre étude.....	50
Figure 19 : Broyage cryogénique avec de l'azote liquide à -196°C (BNL).....	51
Figure 20 : Dispositif d'extraction par micro-onde (EAM).....	52

Liste des figures et des schémas

Figure 21 : Procédé d'extraction par macération classique (EMC).....	53
Figure 22 : Choix du bon révélateur-Spray afin d'optimiser l'analyse HPLC.....	55
Figure 23 : A : Test de révélation de standards et de quelques échantillons racinaires et aériens pour un meilleur éluant de l'analyse. B : Test TLC pour tous les échantillons de l'analyse.....	56
Figure 24 : Etapes de l'analyse RMN pour la détermination des standards.....	58
Figure 25 : Résultats du blast des séquences d'ADN testées, confirmant qu'il s'agit de <i>Thapsia garganica</i> L.....	66
Figure 26 : Chromatogramme présentant le pic correspondant à nortrilobolide.....	67
Figure 27 : Chromatogramme présentant le pic correspondant à thapsigargicine.....	67
Figure 28 : Chromatogramme présentant le pic correspondant à thapsigargine.....	68
Figure 29 : Spectre RMN présentant le pic correspondant à nortrilobolide sur la base de A : la RMN du proton et B : la RMN au carbone 13.....	69
Figure 30 : Spectre RMN présentant le pics correspondant à thapsigargicine sur la base de A : la RMN du proton et B : la RMN au carbone 13.....	70
Figure 31 : Spectre RMN présentant le pics correspondant à thapsigargine sur la base de A : la RMN du proton et B : la RMN au carbone 13.....	71
Figure 32 : Présentation des chromatogrammes de quelques échantillons relevant les pics des standards présents dans les extraits de la plante de A à T ; A à E : feuilles de <i>T.garganica</i> de Béjaia ; F à J : racines de <i>T.garganica</i> de Béjaia ; K à N : feuilles de <i>T.garganica</i> de Médéa; O à T : racines de <i>T.garganica</i> de Médéa.....	79
Figure 33 : Teneur en Tg (%) des extraits obtenus par différentes méthodes d'extraction soumises à l'irradiation gamma.....	82
Figure 34 : Teneur en Tc (%) des extraits obtenus par différentes méthodes d'extraction et soumises à l'irradiation gamma.....	83
Figure 35 : Contenance en Nb (%) des extraits obtenus par différentes méthodes d'extraction et soumises à l'irradiation.....	84

Liste des figures et des schémas

- Figure 36 : A** - Diagramme à barres empilées montrant l'effet de l'irradiation gamma sur les niveaux de Thapsigargin (Tg), de thapsigargicine (Tc) et de nortrilobolide (Nb) dans les différents extraits obtenus par les différentes méthodes d'extraction. **B** - Diagrammes montrant l'effet des méthodes d'extraction utilisées sur le rendement d'extraction de la thapsigargine (Tg), de la thapsigargicine (Tc) et du nortrilobolide (Nb) sur des échantillons provenant des deux sites.....87
- Figure 37** : Historgrammes récapitulant l'activité de piègeage du radical DPPH (%) des différentes parties de plante des deux régions selon les fréquences d'irradiation gamma.....94
- Figure 38** : Historgrammes récapitulant l'activité de réaction du cation ABTS (%) des différentes parties de plante des deux régions selon les fréquences d'irradiation gamma.....100
- Figure 39** : Corrélation entre la contenance de *T.garganica* en Tg, Tc et Nb et son activité antioxydante à différentes fréquences d'irradiation.....106
- Figure 40 a** : Principales classes chimiques des extraits de *T.garganica* des deux provenances selon la masse et le diamètre des particules.....118
- Figure 40 b** : Principales classes chimiques des extraits de *T.garganica* des deux provenances selon la masse et le diamètre des particules.....119
- Figure 41 a** : Pourcentage des principaux composés extraits à partir des différentes parties de *T.garganica* par la fibre PDMS/DVB selon la masse et le diamètre des particules.....121
- Figure 41 b** : Aires de pics des principaux composés extraits à partir des différentes parties de *T.garganica* par la fibre PDMS/DVB selon la masse et le diamètre des particules.....122
- Figure 42 a** : Principaux composés extraits à partir des différentes parties de *T.garganica* provenant de Médéa et Béjaïa par la fibre PDMS.....124
- Figure 42 b** : Aires de pics des principaux composés extraits à partir des différentes parties de *T.garganica* provenant de Médéa et Béjaïa par la fibre PDMS.....125
-

Liste des figures et des schémas

- Figure 43 a :** Influence de l'irradiation gamma sur les principales classes chimiques des feuilles de *T.garganica* provenant de Médéa selon la masse analysées par la fibre PDMS.....128
- Figure 43 b :** Influence de l'irradiation gamma sur les principales classes chimiques des feuilles de *T.garganica* provenant de Médéa selon la masse analysées par la fibre PDMS.....129
- Figure 44 a :** Influence de l'irradiation gamma sur le profil quantitatif des principaux composés extraits à partir des feuilles de *T.garganica* provenant de Médéa par la fibre PDMS pour différentes masses.....131
- Figure 44 b :** Influence de l'irradiation gamma sur les aires de pics des principaux composés extraits à partir des feuilles de *T.garganica* provenant de Médéa par la fibre PDMS pour différentes masses.....132
- Figure 45 a :** Influence de l'irradiation gamma sur les principales classes chimiques des feuilles de *T.garganica* provenant de Béjaia selon la masse analysées par la fibre PDMS/DVB.....134
- Figure 45 b :** Influence de l'irradiation gamma sur les principales classes chimiques des feuilles de *T.garganica* provenant de Béjaia selon la masse analysées par la fibre PDMS/DVB.....135
- Figure 46 a :** Influence des irradiations gamma sur le profil quantitatif des principaux composés extraits à partir des feuilles et racines de *T.garganica* de la région de Béjaia par PDMS/DVB selon la masse et le diamètre des particules.....137
- Figure 46 b :** Influence des irradiations gamma sur les aires de pics des principaux composés extraits à partir des feuilles et racines de *T.garganica* de la région de Béjaia par PDMS/DVB selon la masse et le diamètre des particules.....138
- Figure 47 :** Influence de l'irradiation gamma et de la fibre sur le profil chimique des racines de *T.garganica* de la région de Médéa et de Béjaia.....139
- Figure 48 :** Aires de pics totales détectées par l'extraction SPME à partir de fruits de *T.garganica* L. selon les différents paramètres variables.....143
- Figure 49 :** Variation des aires de pics des différentes classes chimiques de l'huile volatile de *T.garganica* L.....145
-

Liste des figures et des schémas

- Figure 50** : Chromatogramme GC-MS (colonne HP5-MS) de la volatile de la graine de *Thapsia garganica* extraite par HS-SPME avec une fibre PDMS (100 µm) masse de 0,05 g et un diamètre de particule moyen $dp = 250\mu\text{m}$ (Broyage cryogénique). Echantillon A.....146
- Figure 51** : Chromatogramme GC-MS (colonne HP5-MS) de la volatile de la graine de *Thapsia garganica* extraite par HS-SPME avec une fibre PDMS (100 µm) masse de 0,02 g et un diamètre de particule moyen $dp = 250\mu\text{m}$ (Broyage cryogénique). Echantillon B.....147
- Figure 52** : Chromatogramme GC-MS (colonne HP5-MS) de la volatile de la graine de *Thapsia garganica* extraite par HS-SPME avec une fibre PDMS (100 µm) masse de 0,1 g et un diamètre de particule moyen $dp = 250\mu\text{m}$ (Broyage cryogénique). Echantillon C..... 148
- Figure 53** : Chromatogramme GC-MS (colonne HP5-MS) de la volatile de la graine de *Thapsia garganica* extraite par HS-SPME avec une fibre PDMS (100 µm) masse de 0,02 g et un diamètre de particule moyen $dp = 65\mu\text{m}$ (Broyage cryogénique). Echantillon D.....149
- Figure 54** : Chromatogramme GC-MS (colonne HP5-MS) de la volatile de la graine de *Thapsia garganica* extraite par HS-SPME avec une fibre PDMS (100 µm) masse de 0,05 g et un diamètre de particule moyen $dp = 65\mu\text{m}$ (Broyage cryogénique). Echantillon E.....150
- Figure 55** : Chromatogramme GC-MS (colonne HP5-MS) de la volatile de la graine de *Thapsia garganica* extraite par HS-SPME avec une fibre PDMS (100 µm) masse de 0,02 g et un diamètre de particule moyen $dp = 250\mu\text{m}$ (Broyage classique). Echantillon F.....151
- Figure 56** : Chromatogramme GC-MS (colonne HP5-MS) de la volatile de la graine de *Thapsia garganica* extraite par HS-SPME avec une fibre PDMS-DVB (65 µm) masse de 0,02 g et un diamètre de particule moyen $dp = 250\mu\text{m}$ (Broyage cryogénique). Echantillon G.....152
- Figure 57** : Effet de la masse (250 µm, broyage cryogénique AVCRG) de *T.garganica* sur les principaux composés isolés par la fibre PDMS.....154
- Figure 58** : Effet de type de fibres sur les aires de pics totales et les surfaces de pics individuelles des composés volatils de *T. garganica*.....156
- Figure 59** : Cercle de corrélation.....166
-

Liste des figures et des schémas

Figure 60 : Distribution des composés chimiques CC de 20 principaux composés d'extraits de fruits.....	168
Figure 61 : Dendrogramme obtenu par analyse de classification ascendante hiérarchique basée sur l'Euclidien Distance entre les groupes des principaux composés des fruits de <i>T. garganica</i>	169
Schéma 1 : Conversion de thapsigargine (1) en thapsigargine epoxide (2).....	25
Schéma 2 : Biosynthèse de la Tg.....	28
Schéma 3.1 : Localisation du site d'étude et de cueillette de la plante <i>T. graganica</i> (<i>Médéa</i>).....	46
Schéma 3.2 : Localisation du site d'étude et de cueillette de la plante <i>T. graganica</i> (<i>Béjaia</i>).....	46
Schéma 4 : Schéma de l'irradiateur pilote de CRNA.....	49

Liste des tableaux

Tableau 1 : Résumé des caractères morphologiques les plus distinctifs et des caractéristiques écologiques de <i>T.garganica</i> selon l'étude Zervakis <i>et al.</i> , (2001). Lors d'évaluation la systématique et la diversité des taxons européens <i>Pleurotus</i> associées à des ombellifères.....	3
Tableau 2 : Fibres de la SPME commercialement disponibles (d'après Vas et Vékey, 2004).....	43
Tableau 3 : Parties de plantes sélectionnées et méthodes d'extraction des extraits méthanoliques (ou extraits volatils).....	53
Tableau 4 : Temps de rétention du nortrilobolide.....	67
Tableau 5 : Temps de rétention de la thapsigargicine.....	67
Tableau 6 : Temps de rétention de la thapsigargine.....	68
Tableau 7 : Effet de la méthode d'extraction et des doses d'irradiation gamma sur la teneur en thapsigargins (%MS) dans les échantillons de <i>T.garganica</i>	80
Tableau 8 : Analyse factorielle bidirectionnelle de la variance sur l'effet de l'irradiation (irradiation gamma), méthode d'extraction et localité sur la variation chimique des extraits de <i>T.garganica</i>	89
Tableau 9 : Comparaison de résultats de l'activité antioxydante (DPPH) de <i>T.garganica</i> avec d'autres études ultérieures.....	96
Tableau 10 : Activité antioxydante des extraits méthanoliques de <i>T. garganica</i> obtenus par MC après irradiation gamma à différentes doses.....	102
Tableau 11 a : Composition chimique qualitative et quantitative des volatiles des racines et feuilles de <i>T.garganica</i> identifiées avec l'analyse HS-SPME en utilisant la fibre PDMS.....	111
Tableau 11 b : Composition chimique qualitative et quantitative des volatiles des racines et feuilles de <i>T.garganica</i> identifiées avec l'analyse HS-SPME en utilisant la fibre PDMS/DVB.....	115

Liste des tableaux

Tableau 12 : Pourcentage total de surface des pics des composés extraits des volatiles des graines de <i>T.garganica L</i>	144
Tableau 13 : Composition en pourcentage des volatiles obtenues par la méthode HS-SPME-GC-MS de <i>T.garganica L</i>	161
Tableau 14 : Matrice de Correlation.....	166

Table de matière

Remerciement

Dédicaces

Liste des abréviations

Liste des figures et schémas

Liste des tableaux

Table de matière

Introduction générale 1

Partie Bibliographique

Chapitre 1 : La chimie verte et ces procédés 3

Introduction 3

A. Chimie verte 3

B. Extraction verte 4

 I. Définition de l'extraction verte..... 4

 II. Principes de l'extraction verte..... 5

 III. Nouvelles techniques d'extraction verte..... 6

Conclusion 6

Chapitre 2 : L'irradiation ionisante par rayons gamma : présentation et applications.....7

1. Introduction7

2. Qu'est-ce que l'irradiation..... 7

3. Normes internationales 8

 a) Normes mondiale pour les aliments irradiés..... 9

 b) Législations atravers le monde 9

 c) Législation en Algérie 9

4. Emballage et étiquetage des produits irradiés 9

 4.1. Salubrité et innocuité des aliments irradiés 10

5. Utilisation de la technique de l'irradiation pour la conservation des aliments 10

6. Autres applications agricoles 11

 6.1. Lutte contre le ver de la datte par la technique des insectes stériles..... 11

Table de matière

6.2. Effet des rayonnements ionisants sur les cellules vivantes (propriétés bactéricide et antimicrobienne).....	12
6.3. Amélioration des plantes	12
6.4. Valorisation de sous-produits.....	13
6.4.1. Synthèse de biofilms comestibles et biodégradables à base de protéines laitières (lactosérum) par irradiation gamma	13
7. Expérience algérienne dans la conservation des aliments par irradiation	14
7.1. Inhibition	14
7.1.1. Inhibition de la germination de la pomme de terre par irradiation gamma	14
7.1.2. Inhibition de la germination de l'oignon par irradiation gamma	14
7.2. Désinsectisation	14
7.2.1. Désinfestation des produits céréaliers	14
7.2.1.1. Conservation du blé par irradiation gamma	14
7.2.2. Désinsectisation des légumineuses : du pois-chiche par irradiation gamma	14
7.2.3. Désinsectisation des dattes par irradiation gamma	14
7.3. Assainissement microbien	15
7.3.1. Décontamination des épices par irradiation gamma	15
7.3.2. Décontamination du poulet par irradiation gamma	15
8. Conclusion.....	15
 <i>Chapitre 3 : Extraction assistée par micro-ondes des substances volatiles et extraits aromatiques.....</i>	16
I. Les micro-ondes.....	16
I.1. Énergie micro-onde.....	16
I.2. Technologie du four à micro-ondes.....	16
I.3. Chauffage micro-ondes.....	18
I.4. Interactions ondes - matière	18
I.5. Spécificité du chauffage microonde	20
II. Application de la méthode aux différentes plantes médicinales et aromatiques	20
III. Nouvelles méthodes d'extraction.....	21
III.1. Méthodes modernes à haut rendement	21

Table de matière

Chapitre 4 : plantes médicinales, choix et usages	22
1. Plantes médicinales.....	22
2. Métabolites secondaires des plantes	22
3. Utilisation des plantes en médecine traditionnelle.....	22
4. Critères de choix et de sélection d'une plante à intérêt	23
4.1. Aspects chimiotaxonomiques.....	23
4.2. Apports de la littérature	23
4.3. Plantes médicinales étudiées	23
Chapitre 5 : Les Apiacées, genre <i>Thapsia</i> et <i>Thapsia garganica</i> L.....	24
Introduction	24
I. Genre <i>Thapsia</i> (<i>Thapsia</i> genus)	24
I.1. Phylogénie de <i>Thapsia</i> L.....	24
I.2. Etude phytochimique du genre <i>Thapsia</i>	25
I.3. Sesquiterpènes lactones du <i>Thapsia</i> spp. : Thapsigargins.....	26
I.3.1. Thapsigargine.....	26
I.3.2. Découverte de la thapsigargine	27
I.4. Thapsigargins et la biosynthèse de guaianolide dans <i>Thapsia</i>	27
I.4.1. Biosynthèse de thapsigargins	28
I.5. Plateformes de production de thapsigargins	29
I.5.1. Production agricole.....	29
I.5.2. Cultures d'organes pour la production de la thapsigargine	29
I.5.3. Production dans hôtes hétérologues	29
I.5.4. Synthèse chimique de la thapsigargine	30
I.6. Pharmacologie du thapsigargins	30
I.6.1. Effet pharmacologique de thapsigargins	30
I.6.2. Introduction dans la médecine traditionnelle à la lutte contre le cancer	30
Conclusion.....	32

Table de matière

II. Plante étudiée : <i>Thapsia garganica</i> L.	33
II.1. Taxonavigation	33
II.2. Nomenclature	33
II.3. Description Botanique	33
II.3.1. Biotope et distribution géographique	34
II.3.2. Identification botanique.....	34
II.3.3. Identification chimique	35
II.4 Intérêts de la plante	36
II.4.1. Usages traditionnels.....	36
II.4.2. Utilisations thérapeutiques	37
II.5. Toxicité de <i>T.garganica</i>	37
II.5.1. Parties et principes toxiques.....	37
II.5.2. Un angioedème de topographie bilatérale suite au contact avec <i>T.garganica</i> :	38
II.5.3. Etude de la toxicité de <i>Thapsia garganica</i> in vivo :.....	38
II.5.4. Circonstances de l'intoxication	38
II.5.5. Symptomatologie.....	38
II.5.6. Traitement	39
 Chapitre 6 : HS-SPME : Procédé d'identification chimique	40
Introduction.....	40
I. Description de la technique SPME	40
I.1. Principe	40
II. Paramètres influençant l'extraction SPME	42
III. Applications de l'extraction par micro-extraction en phase solide en espace de tête (Head space solide phase micro-extraction HS-SPME).....	44
Conclusion	44

Table de matière

Partie expérimentale

Matériels et Méthodes

<i>Chapitre 1 : Présentation du matériels et des méthodes utilisés dans la première partie de l'étude</i>	45
I. Matériels	45
I.1. Matériel végétal	45
I.1.1. Coordonnées GPS des deux zones d'étude	45
I.1.2. Extraction, amplification et séquençage d'ADN	47
I.1.3. Irradiation	47
I.1.3.1. Appareillages utilisés	47
I.1.3.1.1. Irradiateur pilote du CRNA	47
I.1.3.1.2. Sources	47
I.1.3.1.3. Système dosimétrique	48
I.1.3.2. Traitement des échantillons	49
I.2. Matériel chimique	50
II. Méthodes	51
II.1. Techniques d'extraction	51
II.1.1. Extraction classique des extraits méthanoliques de la partie racinaire et la partie aérienne (EC), utilisant l'azote liquide N ₂ à -196 ° C pour le broyage (ENL) (Fig.19) ...	51
II.1.2. Extraction assistée par micro-ondes des extraits méthanoliques des racines et des feuilles irradiées et non irradiées (EAM)	52
II.1.3. Extraction par macération classique des extraits méthanoliques des racines et de la partie aérienne irradiées et non irradiées (MC)	52
II.2. Technique analytique	54
II.2.1. Optimisation de l'analyse HPLC	54
II.2.2. Analyse des échantillons de la plante <i>T.garganica</i> par HPLC	57
A. Les standards	57
B. Les échantillons	58
II.3. Analyse de l'activité antioxydante	59
A. Tests effectués :	59

Table de matière

1. Effet scavenger du radical DPPH :	59
1.1. Préparation d'une solution mère d'échantillon	59
1.2. Préparation de la solution alcoolique de DPPH.....	59
1.3. Protocole expérimental.....	60
1.4. Calcul des pourcentages d'inhibitions.....	60
1.5. Calcul des IC50.....	60
2. Test ABTS ou 2,2-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) radical scavenging activity (ABTS).....	61
2.1. Préparation de la solution du radical ABTS	61
2.2. Mode opératoire.....	61
2.3. Calcul du pourcentage d'inhibition.....	61
II.4. Analyse de la volatile des racines et feuilles de <i>T.garganica</i> par HS-SPME-CG-MS.....	62
1. Rectification cryogénique (cryogrinding).....	62
2. Produits chimiques.....	62
3. Méthodes d'analyse utilisées	62
3.1. Broyage ambiant et cryogénique.....	62
3.2. Analyse par micro-extraction en phase solide en phase solide (HS-SPME).....	62
3.3. Analyse GC.....	63
3.4. Analyse GC-MS	63
Chapitre 2 : Présentation du matériels et des méthodes utilisés dans la deuxième partie de l'étude.....	64
Analyse SPME-CG-MS des fruits de <i>T.garganica</i>	64
I. Matériel :.....	64
1. Matériel végétal.....	64
2. Matériel de broyage et produits chimiques	64
II. Méthodes.....	65
1. Méthdes analytiques.....	65
2. Analyses statistiques.....	65

Table de matière

Résultats et Discussions

<i>Chapitre 1 : Illustration des différents résultats des analyses testées dans la première partie de l'étude</i>	66
Analyse chromatographique des racines et feuilles de <i>T.garganica</i> et de leurs volatiles sous l'effet des rayons gamma	66
I. Identification de la plante	66
II. Résultats de l'analyse HPLC.....	66
II.1. Analyse chromatographique des standards étudiés	66
II.2. Analyse du profil chimique des racines et feuilles de <i>T. garganica</i> par HPLC....	72
II.2.1. Effet de la technique d'extraction sur la composition en thapsigargins	72
II.2.1.1. Méthode d'extraction par macération	81
II.2.1.2. Méthode d'extraction: extraction au solvant par micro-ondes ESAM	85
II.2.1.3. Méthode d'extraction classique après broyage avec de l'azote liquide (EC)..	85
II.2.1.4. Conclusion	89
III. Evaluation des résultats de l'activité antioxydante des plantes	90
III.1. Evaluation de l'activité de piégeage du radical DPPH %.....	90
III.2. Evaluation de l'activité réduction du radical cation d'ABTS %.....	97
IV. Etude des interactions entre les substances actives, leurs activités biologiques selon les traitements et les paramètres fixés de l'étude	101
IV.1. Effet de l'irradiation gamma sur les propriétés antioxydantes de <i>T.garganica</i>	101
IV.2. Effet simultané de l'extraction des micro-ondes et des doses d'irradiation gamma sur la capacité antioxydante de <i>T.garganica</i>	103
IV.3. Effet simultané de l'extraction micro-onde et l'irradiation gamma sur la capacité antioxydante de <i>T.garganica</i> et la teneur en Tg, Tc et Nb	105
Conclusion	109
V. Résultats de l'analyse HS-SPME-CG-MS.....	110
V.1. Etude de la volatile des feuilles et racines de <i>T.garganica</i>	110
V.1.1. Effet de la masse et du diamètre des particules sur la composition chimique de la volatil des racines et feuilles de <i>T.garganica</i>	117
V.1.2. Principaux composés chimiques spécifiques aux différentes classes chimiques de <i>T.garganica</i>	120

Table de matière

V.1.3. Etude quantitative et qualitative des principaux composés chimiques identifiés par la fibre PDMS (m=0.1g, dp=85µm).....	123
Conclusion.....	126
V.1.4. Effet de rayonnements gamma sur le profil chimique qualitatif et quantitatif de la volatile des différentes parties de <i>T.garganica</i>	127
V.1.4.1. Effet de l'irradiation gamma sur les classes chimiques que contient <i>T.garganica</i> originaire de Médéa	127
V.1.4.2. Effet de l'irradiation gamma sur les principaux composés chimiques de la volatile	130
V.1.4.3. Effet de l'irradiation gamma sur les classes chimiques que contient <i>T.garganica</i> originaire de Béjaïa	133
V.1.4.4. Effet de l'irradiation gamma sur les principaux composés caractérisant ces classes chimiques que contient la plante originaire de Béjaïa.....	136
V.1.4.5. Influence du type de la fibre d'analyse SPME sur l'aspect qualitatif et quantitatif des classes chimiques extraites et identifiées partir des plantes irradiées	139
Conclusion	140
 <i>Chapitre 2 : Illustration des différents résultats des analyses testées dans la deuxième partie de l'étude.....</i>	142
Analyse HS-SPME-CG-MS des fruits de <i>T.garganica</i>.....	142
I. Effet de la masse et de la taille des particules sur la composition chimique de la volatile de <i>Thapsia garganica</i>	142
II. Effet de la nature de la fibre sur la composition chimique	155
III. Effet du mode de broyage sur la composition chimique.....	158
IV. Analyses statistiques	166
1. Distribution et relation entre variables.....	166
2. Analyse des composants préliminaires (ACP) et classification ascendante hiérarchique (CAH) des principaux composés identifiés.....	167
V. Conclusion	170
Approches.....	171
 <i>Conclusion générale</i>	173

Table de matière

Références bibliographiques

Annexes

Publications et communications

Introduction

Introduction générale

Parmi les plantes médicinales et aromatiques qui ont été illustrées dans le capitulaire *De Villis*, 73 sont des herbes dont font partie la famille des Apiacées, devenues intéressantes dans le domaine thérapeutique.

Le développement de la chimie moléculaire a fait le déclin de la phytothérapie parallèlement entre la fin du XIXème siècle et le XXème siècle. Cette dernière qui voit un regain d'intérêt depuis les années 1970 pour un retour aux thérapeutiques dites « naturelles ».

Dans le travail proposé, nous nous intéressons à une espèce appartenant à la famille de plantes autrefois appelée Ombellifères en référence à leur inflorescence, en forme d'ombelles, actuellement nommée Apiacées. Certaines plantes de cette famille sont en particulier utilisées lors de troubles digestifs de type dyspepsies, météorisme, ballonnements et douleurs intestinales, et comme anti-inflammatoires il s'agit donc d'une espèce du genre *Thapsia* : "*Thapsia garganica L.*".

Après avoir décrit la famille des Apiacées, ainsi que l'espèce et son intérêt dans beaucoup de domaines à travers plusieurs études, nous nous intéressons dans la première partie de l'étude à décrire les différentes méthodes d'extractions des principaux composants de la plante à effets thérapeutiques, médicinales et industrielles; en se basant sur les techniques d'extraction verte et durable qui sont un vrai sujet d'actualité, amis environnementaux et économiques, il s'agit de ce fait de la technique d'extraction assistée par micro-ondes et de la micro-extraction en phase solide (HS-SPME).

Vue l'importance d'une préservation des substances naturelles de la plante, nous avons pris en considération, parmi les moyens de conservation assurant la stabilité de l'innocuité et de la charge microbienne et surtout le maintien du pouvoir antioxydant des extraits de végétaux donnant leurs propriétés biologiques et médicinales, le traitement par irradiation par rayons gamma de la plante et son impact sur l'aspect qualitatif et quantitatif du profil chimique des extraits.

Ce projet de thèse a pour but d'évaluer le profil chimique qualitatif et quantitatif des différents extraits des feuilles et des racines de *T.garganica* provenant de deux régions différentes, obtenues par trois techniques d'extraction, macération (MC), extraction avec solvant assistée par microonde (ESAM) et une extraction classique (EC) en utilisant un broyage

cryogénique avec de l'azote liquide à -196°C et de quantifier trois principes actifs spécifiques à la plante par la technique chromatographique (HPLC).

L'introduction simultanée des radiations électromagnétiques des micro-ondes et du broyage cryogénique au moyen de l'azote liquide avait dans cette partie pour objectifs majeurs de favoriser le phénomène de transfert de matière en accélérant le processus d'extraction, et de réduire le chauffage durant l'extraction en éliminant au maximum les dégradations thermiques provoquées par le broyage classique.

Une analyse de la partie volatile des racines et feuilles de *T.garganica* a été envisagée dans un second lieu dans cette partie par la technique Head space-Solide Phase Micro-extraction (HS-SPME), afin d'évaluer qualitativement et semi-quantitativement leurs profils chimiques sous l'effet de l'irradiation gamma.

D'autre part, dans la deuxième partie de l'étude, nous nous sommes intéressés à une technique verte d'extraction qui est la micro-extraction en phase solide en espace de tête des graines de *T. garganica*, permettra l'identification de leurs principaux constituants chimiques, qualitative et semi-quantitative en fonction de certains paramètres physiques en particulier, la masse et les dimensions des particules, le type de broyage (classique et cryogénique) ainsi que l'effet de la polarité des fibres utilisées.

Le manuscrit est structuré en deux grandes parties :

La partie I portera sur les généralités des plantes médicinales. Les différentes techniques d'extraction utilisées dans ce travail ainsi que les procédés d'identification seront définis.

La partie II traitera l'aspect expérimental. Dont la présentation du matériel et les méthodes utilisées dans les deux volets de ce travail seront développées. Poursuivies par une illustration des différents résultats obtenus lors de l'ensemble de nos études ainsi que leurs interprétations.

Partie

Bibliographique

Chapitre 1 : La chimie verte et ces procédés

Introduction

La chimie est la science qui s'intéresse à la structure, aux propriétés et aux transformations de la matière. C'est également une pratique qui a débuté dans diverses civilisations antiques avec la fabrication et l'utilisation de parfums, d'essences, de décoction, la distillation...

Au XIXe siècle, la chimie organique et la pharmacie ont donné lieu à la naissance de la chimie industrielle, déjà destinée à fournir des biens de consommation courante (colorants et teintures, parfums, quinine, aspirines,...), jouant ainsi un rôle important dans la révolution industrielle.

Elle est aussi une industrie parmi les plus importantes au monde en termes de chiffre d'affaire et d'emploi ; ce double visage trouve son origine dans la pratique de la chimie, qui existe avant même que sa connaissance ne soit analysée conceptualisée et organisée en une véritable discipline scientifique.

A. Chimie verte

Aujourd'hui, l'industrie chimique utilise majoritairement des dérivés pétrochimiques pour fabriquer les substances de base ou les produits finis destinés à des domaines aussi variés que la pharmacie, les cosmétiques, l'agroalimentaire, le bâtiment, l'électronique ou encore l'énergie. Mais pour produire plus en polluant moins, il est nécessaire de concevoir une nouvelle façon de mettre en œuvre les réactions chimiques dont l'industrie a besoin. Grâce à une évolution des connaissances, de la réglementation et de mentalités, la situation s'est améliorée dans les pays industrialisés



Figure 1: Chimie verte durable

cela à partir de 1998, et l'apparition du livre « Green chemistry : theory and practice » qui est basé sur douze principes de bonne pratique de la chimie, formulés par **Anastas et warner, 1998**.

B. Extraction verte

L'extraction de produits naturels a été utilisée depuis l'époque à nos jours dans différents domaines : parfumerie et cosmétique, médecine pharmaceutique, industries alimentaires et même dans les biocarburants ou de la chimie fine par des procédés innovants d'extraction tels que (macération, vapeur ou hydrodilution, pressurage, décoction, percolation et Soxhlet). Dans l'industrie alimentaire, cette extraction se résume à l'introduction des extraits végétaux et des concentrés de nutraceutiques dans les formulations et composés bioactifs ou leurs précurseurs (antibiotiques, agents chimio-préventifs, alcaloïdes, etc.) qui sont extraits par des méthodes classiques ou des technologies modernes cherchant des solutions qui minimisent l'utilisation de solvants, tout en permettant l'intensification du processus et une rentabilité notable d'extraits de haute qualité.

I. Définition de l'extraction verte



Une définition générale de la chimie verte est l'invention, la conception et l'application de produits chimiques et de procédés pour réduire ou éliminer l'utilisation et la génération de substances dangereuses. Tandis que l'extraction verte de produits naturels, repose sur la découverte et la conception de procédés d'extraction qui réduiront la consommation d'énergie, permettront l'utilisation de solvants alternatifs et de produits naturels renouvelables et assureront une sécurité ainsi qu'un extrait et produit de haute qualité. **Chemat,2015.**

Trois grandes solutions ont été identifiées pour concevoir et démontrer l'extraction verte au laboratoire et à l'échelle industrielle afin d'approcher une consommation optimale de matières premières, de solvants et d'énergie :

- 1) l'amélioration et l'optimisation des procédés existants ;
- 2) la non utilisation d'équipements non adaptés ;
- 3) l'innovation dans les processus et les procédures mais aussi dans la découverte de solvants alternatifs.

II. Principes de l'extraction verte

La liste des «six principes de l'extraction verte de produits naturels», Chemat, 2015 ; devrait être considérée pour l'industrie et les scientifiques comme une direction pour établir une étiquette verte, une charte et une norme innovatrice et comme une réflexion pour innover non seulement dans le processus mais dans tous les aspects d'extraction solide-liquide (Fig.2) :

- Innovation par sélection des variétés et utilisation des ressources végétales renouvelables.
- Utilisation de solvants alternatifs et principalement d'eau ou d'agro-solvants.
- Réduire la consommation d'énergie par la récupération d'énergie et l'utilisation de technologies innovantes.
- Production de coproduits au lieu de déchets pour inclure l'industrie du bio-agro-raffinage.
- Réduire les opérations de l'unité et favoriser des processus sûrs, robustes et contrôlés.
- Viser un extrait non dénaturé et biodégradable sans contaminants.

Ces principes ont été identifiés et décrits comme des exemples innovants à suivre, découverts par les scientifiques et appliqués avec succès par l'industrie.



Figure 2 : Intérêt de la chimie verte et de l'extraction verte

III. Nouvelles techniques d'extraction verte

Une nouvelle technique d'extraction sans solvant assistée micro-ondes, baptisée Microwave Hydro-diffusion and Gravity (MHG), a été utilisée pour l'extraction d'huiles essentielles, de colorants et d'antioxydants. Il s'agit d'un alambic à micro-onde original "à l'envers" combinant le chauffage par micro-ondes et la gravité de la terre à la pression atmosphérique.

Basé sur un principe relativement simple, ce procédé implique la mise en contact du matériel végétal avec les micro-ondes, sans addition de solvant ou d'eau. Le chauffage interne de l'eau in situ dans le matériel végétal conduit à la rupture des glandes et des réceptacles oléifères des cellules végétales. Les principaux actifs sont transférés donc par convection du cœur du végétal et chutent par gravité hors du réacteur à micro-ondes (**Abert *et al.*, 2008**).

Conclusion

La notion de l'extraction actuelle, introduit le concept de l'extrait vert obtenu de manière écologique et économique avec moins d'impact possible sur l'environnement et en protégeant les consommateurs (moins d'énergie et de solvants, etc.) et en planifiant le recyclage des coproduits (biodégradabilité, etc.)

De même, elle renforce la concurrence des industries pour qu'elles soient plus écologiques, économiques et innovantes, afin d'avoir un résultat d'extrait vert de valeurs sur toute sa chaîne de transformation de l'extraction jusqu'à commercialisation dont il répondra aux normes internationales.

Chapitre 2 : L'irradiation ionisante par rayons gamma : présentation et applications

1. Introduction

Les producteurs et les consommateurs ont des attentes claires en matière de fruits et légumes frais en ce qui concerne leur apparence, leur texture, leur saveur et leur goût. Ces attributs semblent être le résultat d'un nombre important de facteurs avant et après la récolte. La plupart d'entre eux sont influencés par les directives de gestion suivies par les agriculteurs (biologiques et conventionnels). À cet égard, plusieurs études ont rapporté des résultats controversés sur la qualité des produits biologiques et conventionnels, y compris des composés liés à la santé. L'impact de saveur est un mélange complexe de produits chimiques organiques volatils et contributeurs goût.

Plusieurs études ont montré que le retrait d'une seule substance d'un mélange ne conduit pas nécessairement à un changement notable (**Laska et Hudson, 1993a,b**) et que certains composés (composés clés) peuvent grandement modifier les profils sensoriels (**Dharmawan et al.,2008**), même à très faible concentration. Une mutation est aléatoire, son effet peut être bénéfique ou néfaste, elle peut apparaître de façon spontanée avec une fréquence généralement faible, mais peut être induite par des agents chimiques ou physiques notamment les rayonnements ionisants et dans le cas on parle de Radiomutagenèse. Les emballages constituent un problème environnemental. Des recherches ont permis de développer quelques polymères à base de protéines laitières. Ils sont entièrement biodégradables et peuvent être comestibles lorsque les additifs sont autorisés dans l'industrie alimentaire.

2. Qu'est-ce que l'irradiation

L'irradiation consiste à soumettre un aliment aux rayonnements d'une source radioactive ou à un faisceau d'électrons. Lorsque les molécules de ce produit sont exposées aux rayonnements gamma dans un irradiateur, certaines d'entre elles perdent un ou plusieurs électrons qui gravitent autour de leur noyau. Elles deviennent « ionisées », mais leur noyau reste intact. Ces ions et ces électrons éjectés réagissent à leur tour avec d'autres atomes et molécules.

L'ionisation des aliments est essentiellement utilisée pour améliorer leur conservation, souvent en remplacement de conservateurs chimiques ou du froid.

Les doses les plus faibles empêchent la germination (pommes de terre, oignons,...) ou détruisent les insectes (céréales,...). Les doses les plus élevées sont utilisées pour éliminer des bactéries pathogènes (épices, volailles,...) ou pour augmenter la durée de conservation (légumes, viandes,...).

L'irradiation des aliments offre aussi d'autres avantages tels que le :

1. Retard du murissement.
2. Prolongement de la durée de vie de l'aliment.
3. La conservation des aliments.
4. La production de nouveaux produits (biofilms,...).
5. La transformation de produits existants (radiomutagénèse).
6. La lutte contre un fléau ou maladie dans les produits agricoles.

3. Normes internationales

L'ionisation des aliments est soumise à des normes qu'on doit respecter pour ne pas altérer la qualité de l'aliment traité. A cet effet, il est nécessaire de connaître la dose que reçoit l'aliment traité par rayon gamma. Une étude dosimétrique est indispensable afin de déterminer la distribution des doses dans un élément traité par rayonnement gamma.

Les dosimètres sont des dispositifs capables de fournir une mesure quantitative et reproductible de dose par le changement d'une ou de plusieurs de leurs propriétés physiques, en fonction de l'exposition à l'énergie du rayonnement ionisant.

Un système de dosimétrie est constitué de dosimètres et d'instruments de mesure. Le choix d'un système approprié de dosimétrie pour l'irradiation des aliments dépend de divers facteurs, comprenant la gamme de doses nécessaire pour atteindre un objectif technologique particulier, le coût, la disponibilité et la facilité d'utilisation. Dans l'irradiation des aliments, la mesure essentielle est la dose absorbée.

La commission du *Codex alimentarius* a été créée en 1962, par accord entre deux institutions de l'ONU : la FAO (fondée en 1945) et l'OMS (fondée en 1948). Ce code a été la conséquence, d'une part, du progrès des connaissances biologiques et chimiques concernant les produits alimentaires, permettant d'analyser beaucoup plus finement les propriétés de ceux-ci, et d'autre part, de l'emploi de nouvelles techniques de production fondées sur des connaissances nouvelles. Ce code de pratique pour l'irradiation des aliments détermine les pratiques essentielles à mettre en œuvre, afin de réaliser une irradiation efficace des produits alimentaires de manière à conserver la valeur nutritionnelle, et permet d'avoir des produits alimentaires sains.

a) Norme mondiale pour les aliments irradiés

Sur la base des conclusions auxquelles est arrivé le Comité mixte d'experts FAO/OMS/AIEA, la Commission du Codex Alimentarius, organe mixte de la FAO et de l'OMS, représentant plus de 130 pays, a adopté **la Norme Mondiale pour les aliments irradiés (Codex Stan 106-1983)**. Cette norme qui est publiée dans le volume XV du Codex Alimentarius, première édition de 1984, s'applique à toutes les denrées alimentaires irradiées jusqu'à une **dose moyenne globale de 10 KGy**.

Il est souligné que cette valeur de dose ne représente pas la limite supérieure au-delà de laquelle le produit devient toxique, mais simplement le niveau jusqu'auquel il a été établi que le traitement ionisant est sûr et ne représente aucun danger pour les consommateurs.

b) Législations à travers le monde

L'irradiation de la pomme de terre aux fins d'inhibition de la germination a été autorisée définitivement et d'une façon inconditionnelle dans l'ex-URSS des 1958. Au Canada et aux États Unis d'Amérique des agréments définitifs ont été délivrés pour l'irradiation de la pomme de terre, respectivement en 1960 et 1964. L'irradiation de certains aliments et ingrédients alimentaires est réglementée dans l'UE par la directive 1999/2/CE (Communautés européennes, **1999a**). La liste communautaire des denrées alimentaires susceptibles d'être traitées avec des rayonnements ionisants à l'exclusion de toutes les autres et les doses maximales de rayonnement autorisées figurent dans la directive 1999/3/CE (Communautés européennes, **1999b**).

Aujourd'hui, 45 pays ont autorisé l'irradiation d'une ou plusieurs denrées alimentaires dont vingt-cinq exploitent actuellement ce procédé à des fins commerciales. Près de 50 irradiateurs traitant les aliments sont en opération dans le monde, et leur nombre ne cesse de croître.

c) Législation en Algérie

En Algérie l'irradiation des denrées alimentaires est régie par le décret présidentiel N° 05-118 du 11 avril 2005. Ce décret fixe les règles de traitement, de contrôle et de commerce des denrées alimentaires traitées par ionisation. La dose maximale applicable est fixée à 10 KGy, conformément à la norme du Codex Alimentarius.

4. Emballage et étiquetage des produits irradiés (Fig.3)

L'avantage que présente le traitement par ionisation est que les produits traités sont emballés avant irradiation car le rayonnement gamma a un pouvoir de pénétration élevé. Pour éviter la contamination ou l'infestation après l'irradiation, l'emballage doit présenter une barrière efficace contre la recontamination et la ré-infestation.



Figure 3: Logo caractérisant les aliments traités par ionisations

4.1. Salubrité et innocuité des aliments irradiés

La première réunion internationale, consacrée exclusivement à la discussion des données scientifiques sur la salubrité et l'innocuité des aliments irradiés, et des aspects législatifs de l'irradiation des aliments, s'est tenue en 1961 à Bruxelles sous l'égide de trois organisations internationales compétentes en la matière, à savoir l'Organisation pour l'Alimentation et l'Agriculture des Nations Unies (FAO), L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et l'Agence Internationale de l'Energie Atomique (AIEA).

Ce n'est qu'après une série de réunions, (Rome, 1964, Genève, 1969, Genève 1976) que le Comité mixte d'expert FAO/AIEA/OMS est arrivé, en 1980 à la rencontre de Genève, à la conclusion que l'irradiation de tout aliment jusqu'à la dose moyenne globale de 10 KGy ne présente aucun risque toxicologique, et que des analyses toxicologiques sur des aliments irradiés sont inutiles. Il conclut de même que l'irradiation à 10 KGy ne provoque aucun problème particulier d'ordre nutritionnel ou microbiologique.

5. Utilisation de la technique de l'irradiation pour la conservation des aliments

L'utilisation des rayonnements ionisants pour la conservation des denrées alimentaires est une technique adoptée dans plusieurs pays développés. Elle offre des perspectives prometteuses pour les pays en voie de développement.

L'irradiation des aliments est le traitement des produits alimentaires au moyen d'un rayonnement ionisant en vue de :

- Contrôler les pathogènes d'origine alimentaire.
- Réduire la charge microbienne et l'infestation des denrées alimentaires par les insectes.
- Inhiber la germination des racines alimentaires.
- Prolonger la durée de conservation des denrées périssables.

De nombreux pays utilisent des irradiateurs industriels pour traiter les produits alimentaires à des fins commerciales. Plusieurs études ont été menées dans des travaux de recherche dont nous citons quelques applications.

6. Autres applications agricoles

6.1. Lutte contre le ver de la datte par la technique des insectes stériles

La production dattière est constamment soumise à des attaques du ver de la datte (*Ectomyelois ceratoniae*) qui constitue la contrainte essentielle à la commercialisation des dattes. La pratique traditionnelle de lutte contre ce ravageur encore basée essentiellement sur la fumigation par le bromure de méthyle ne donne pas satisfaction et se heurte à la problématique des résidus sur les dattes, handicap de taille à l'exportation.

Dans la perspective de lever cet obstacle, l'INPV (Institut National de la Protection des Végétaux) a engagé, avec la coopération de l'AIEA, un programme de lutte utilisant la Technique des Insectes Stériles (TIS). Cette technique, déjà développée par l'AIEA contre la mouche du bétail (lucilie bouchère), la mouche des fruits (cératites des agrumes) et le ver des pommes (carpocapse), a pour avantage de pouvoir contribuer à la résolution du problème sans atteinte à l'équilibre oasien.

Le principe repose sur l'utilisation du ver de la datte comme agent de sa propre perte, d'où encore l'appellation de lutte autocide (**Source CRNA**).

La stratégie fait appel au protocole suivant :

- Production en masse de la pyrale de la datte en installation contrôlée.
- Irradiation des mâles de la pyrale à l'aide de rayons gamma à des doses suffisantes pour les rendre stériles, sans affecter leurs capacités biologiques à s'accoupler.
- Lâchers des mâles stérilisés dans les palmeraies à protéger.
- Les mâles stérilisés entrent en compétition avec les mâles sauvages pour l'accouplement avec les femelles.
- Les femelles accouplées avec les mâles stériles pondent des œufs stériles.
- La répétition de ce protocole entraîne la réduction progressive du ravageur.

Cette étude a permis de pratiquer et de maîtriser les aspects suivants :

- ✓ La méthodologie liée à l'élevage individuel des pyrales.
- ✓ La maîtrise des expositions des mâles aux irradiations.
- ✓ La technique de transfert sur de longues distances des mâles traités.
- ✓ Technique des lâchers dans les palmeraies.
- ✓ Méthode d'évaluation de l'impact sur le terrain.

6.2. Effet des rayonnements ionisants sur les cellules vivantes (propriétés bactéricide et antimicrobienne)

L'effet du rayonnement gamma sur la matière se traduit par des ruptures de liaisons moléculaires des entités chimiques soit directement soit indirectement par action des produits de radiolyse de l'eau.

Lors de l'irradiation des organismes vivants, certaines liaisons sont brisées au niveau des molécules essentielles à leur survie, notamment l'ADN (acide désoxyribonucléique), tuant ainsi ces organismes. C'est cette propriété bactéricide et insecticide qui permet la désinsectisation et l'assainissement microbien des denrées alimentaires infestées ou contaminées.

Ces ruptures de liaisons sont de même à l'origine du ralentissement du processus de murissement de certains fruits et de l'inhibition de la germination des bulbes et tubercules.

Les études menées depuis plus de 40 ans sur l'application de l'irradiation à la conservation des aliments avaient porté aussi bien sur la technologie du processus que sur la salubrité des aliments irradiés. La faisabilité technico économique a été démontrée dans de nombreux cas d'application. Les recherches menées à travers le monde ont démontré l'innocuité de ce traitement et sa capacité à réduire les pertes alimentaires et à éviter les maladies transmissibles par les aliments.

Selon les doses appliquées, l'irradiation permet de détruire les agents biologiques d'altération (micro-organismes, insectes et parasites) et d'inhiber divers processus physiologiques et métaboliques responsables de la dépréciation de certaines denrées alimentaires, tels que la maturation et la germination. Actuellement, 45 pays ont approuvé le recours à l'irradiation pour traiter une ou plusieurs denrée(s) alimentaire(s).

L'irradiation est un procédé physique qui n'engendre pas de résidus dans les aliments traités. Ces derniers peuvent être consommés immédiatement après l'irradiation (**Source CRNA**).

6.3. Amélioration des plantes

Les mutations sont considérées comme la source de toute variabilité génétique, le terme « mutation » désigne des variations héréditaires du génotype d'un individu.

Une mutation est aléatoire, son effet peut être bénéfique ou néfaste, elle peut apparaître de façon spontanée avec une fréquence généralement faible, mais peut être induite par des agents chimiques ou physiques notamment les rayonnements ionisants et dans ce cas on parle de Radiomutagenèse (**Source CRNA**).

Cette approche est devenue un outil supplémentaire, utilisé dans les programmes d'amélioration des plantes, permettant ainsi :

- Création de nombreuses variétés mise par la suite à la disposition des cultivateurs.
- Résistance aux maladies.
- Résistance aux différents stress hydriques.
- Résistance aux intempéries.
- Améliorer le rendement ou la qualité d'un caractère désigné.
- Constitue un facteur essentiel de l'évolution génétique des espèces.

6.4. Valorisation de sous-produits

6.4.1. Synthèse de biofilms comestibles et biodégradables à base de protéines laitières (lactosérum) par irradiation gamma

Les emballages constituent un problème environnemental grandissant. Des recherches ont permis de développer quelques polymères à base de protéines laitières. Ils sont entièrement biodégradables et peuvent être comestibles lorsque tous les additifs sont autorisés dans l'industrie alimentaire.

Les rejets massifs de lactosérum dans l'environnement peuvent engendrer une pollution écologique irréversible et occasionnent de nombreux désagréments une fois déversés dans les cours d'eau et les eaux résiduelles vu leur forte charge organique, c'est le cas de l'Algérie.

Ainsi, pour revaloriser du sous-produit de l'industrie laitière, l'équipe de recherche du CRNA a lancé un projet dont l'objectif consiste à produire des biofilms biodégradables voir même comestibles à partir du lactosérum mélangé aux sels de caséinate de sodium.

La synthèse de biofilms fait appel au protocole suivant :

- Récupération du lactosérum au niveau des industries laitières.
- Dosage des protéines du lactosérum.
- Préparation de la solution de biofilm.
- Irradiation de la solution à différentes doses.
- Préparation des films sur un support.
- Récupération des films.
- Tests mécaniques des films obtenus.

L'objectif principal de l'obtention des biofilms est de contribuer à la conservation des aliments (emballage) d'une part et à la valorisation d'un sous-produit agroalimentaire d'autre part (Source CRNA).

7. Expérience algérienne dans la conservation des aliments par irradiation

7.1. Inhibition

7.1.1. Inhibition de la germination de la pomme de terre par irradiation gamma

Les travaux entrepris visaient à déterminer les conditions optimales du traitement par irradiation, afin d'assurer une durée de stockage maximale.

Les principaux résultats concernant ce thème montrent que l'irradiation à la dose de 80 à 100 Gy inhibe la germination des tubercules durant l'entreposage ce qui permet une conservation de 13 à 16 semaines.

7.1.2. Inhibition de la germination de l'oignon par irradiation gamma

Modification physico-chimiques de l'oignon sec irradié et conservé à température ambiante et à 4°C.

Les résultats montrent que l'inhibition totale de la germination est à la dose de 40 Gy.

Cependant, en ce qui concerne les pertes par pourriture, l'emploi du froid est indispensable si la période de stockage est supérieure à trois mois.

7.2. Désinsectisation

7.2.1. Désinfestation des produits céréaliers

Etude des effets du rayonnement gamma sur trois espèces d'insectes ravageurs de grains.

Les résultats obtenus montrent la possibilité de réduire significativement, voir arrêter la prolifération des insectes infestant le blé par irradiation gamma. Les doses utilisées varient de 70 à 500Gy.

7.2.1.1. Conservation du blé par irradiation gamma

Les résultats des travaux réalisés montrent que la dose de 0,25 KGy est suffisante pour garantir la désinfestation du blé emballé dans du papier Kraft ou dans des sacs en jute pendant 06 mois.

7.2.2. Désinsectisation des légumineuses : du pois-chiche par irradiation gamma

Les résultats de cette étude montrent que la dose de 1 KGy semble avoir un effet optimum sur la conservation et sur la qualité du pois-chiche stocké durant 11 mois.

7.2.3. Désinsectisation des dattes par irradiation gamma

Des essais ont montré que l'irradiation gamma à la dose de 0,7 KGy est efficace pour la désinsectisation des dattes. Les propriétés biochimiques et organoleptiques des dattes ne sont pas altérées par le traitement ionisant.

7.3. Assainissement microbien

7.3.1. Décontamination des épices par irradiation gamma

Le traitement à l'aide du rayonnement gamma à la dose de 8 KGy s'avère efficace pour la décontamination sans pour autant altérer la composition biochimique ni les propriétés organoleptiques des épices. Les types d'emballage ENAPAL semblent protéger les épices contre toute recontamination ultérieure après le traitement ionisant.

7.3.2. Décontamination du poulet par irradiation gamma

Il a été démontré que la dose de 5 KGy diminue considérablement la charge microbienne initiale du poulet, ce qui prolonge la durée de conservation sous froid. Par ailleurs, la qualité nutritive (protéines et lipides) est conservée à cette dose.

8. Conclusion

L'efficacité du processus d'irradiation dépend de l'application rationnelle de la dose et la mesure de cette dose. L'utilisation des rayonnements ionisants présente plusieurs applications dans différents domaines. La maîtrise de cette technologie peut résoudre des problèmes pour les utilisateurs potentiels pour la réalisation de différents projets.

Des mesures de répartition de dose devraient être effectuées en vue de caractériser le processus pour chaque produit.

Pour assurer une exécution correcte du processus d'irradiation conformément aux procédures acceptées à l'échelle internationale, on doit utiliser automatiquement des dosimètres.

La technique au niveau pilote est maîtrisée, il serait souhaitable de lancer tous ces travaux à une échelle plus élevée à savoir l'irradiation industrielle.

Chapitre 3 : Extraction assistée par micro-ondes des substances volatiles et extraits aromatiques

I. Micro-ondes

I.1. Énergie micro-onde

Les micro-ondes sont des hyperfréquences et ondes électromagnétiques occupant une bande de fréquence de trois décades de 300 GHz à 300 MHz, dont la fréquence 2450 MHz est la plus utilisée présentant la majorité des magnétrons des fours micro-ondes ayant une puissance de 600 à 1000 Watts et une longueur d'onde dans l'air de 12,2 cm.

L'onde électromagnétique résulte d'un champ électrique \vec{E} et d'un champ magnétique \vec{B} se propageant dans l'espace et variant dans le temps. La propagation de cette onde obéit, quelle que soit la nature du milieu, aux équations de Maxwell. Les applications de ces ondes sont nombreuses et très diverses : la détection électromagnétique ou radar, la poursuite des satellites, la mesure des dimensions d'un objet en cavités résonnantes, l'évaluation de la température par radiométrie, la mesure de l'humidité d'un matériau par le biais de ses caractéristiques, la télévision et les télécommunications par liaisons hertziennes et spatiales.

Les applications énergétiques reposent sur le fait que l'onde est utilisée comme vecteur de puissance électromagnétique. Cette dernière catégorie est rencontrée aussi bien dans les foyers domestiques (chauffage, cuisson, décongélation) que dans l'industrie (séchage, réticulations, extraction).

I.2. Technologie du four à micro-ondes

Un four à micro-ondes est constitué de trois éléments principaux (**Fig.4**) :

- le générateur des micro-ondes,
- le guide d'onde,
- la cavité micro-ondes.

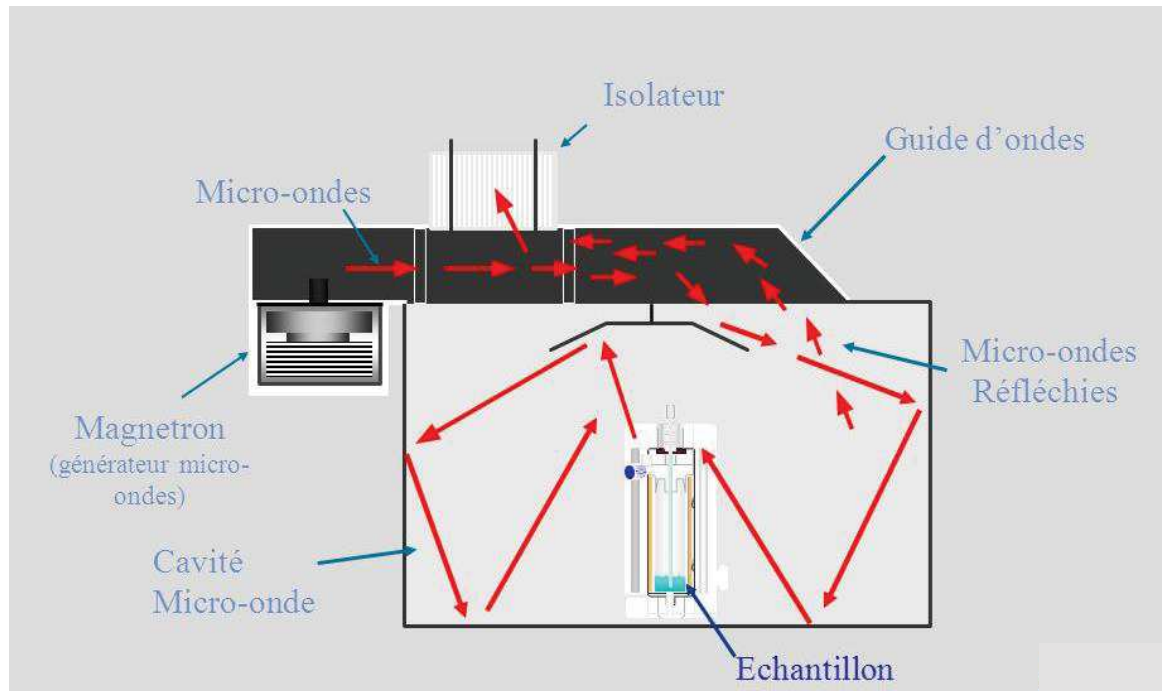


Figure 4 : Eléments d'un four microonde

- Les micro-ondes de forte puissance sont produites par des tubes à vide dont le plus habituel est le magnétron : il s'agit d'une diode thermoïonique composée d'une cathode chauffée qui émet des électrons et d'une anode polarisée positivement par rapport à la cathode pour attirer les électrons par le champ électrique continu E_0 . Ce champ à haute tension est produit par une alimentation électrique à 50 Hz à partir du secteur redressé.
- Le guide d'onde permet de convoyé et de guider les ondes émises par le magnétron. Le guide est généralement un tube métallique ou un conducteur cylindrique dont la section droite est limitée par un contour fermé pouvant contenir d'autres contours. Sa génératrice sera choisie comme axe de propagation. Deux modes de propagation peuvent exister : le mode TM (transverse magnétique), ou bien, le mode TE (transverse électrique).
- L'applicateur est une cavité fermée qui doit assurer le transfert au matériau à traiter de l'énergie électromagnétique provenant du magnétron. Deux grandes catégories d'applicateurs existent : les applicateurs monomodes et les applicateurs multimodes. Un applicateur est dit monomode lorsque ses dimensions géométriques sont choisies de telle sorte qu'à la fréquence de travail, il n'existe qu'une configuration de champ. L'énergie électromagnétique emprisonnée se réfléchit sur les parois et donne lieu à des ondes stationnaires. Ce type d'applicateur permet ainsi le contrôle précis du champ électrique, il est cependant réservé aux matériaux de petit volume. L'applicateur multimode consiste en une cavité suffisamment

grande et présente plusieurs types de configurations de champ. Le champ électrique n'y est pas stable comme dans une cavité monomode et sa distribution varie. Il est préférable d'utiliser des applicateurs multimodes pour le traitement des volumes importants, et des matériaux dont les paramètres électriques et magnétiques varient peu (Lucchesi, 2005).

I.3. Chauffage micro-ondes

Le chauffage par micro-ondes se fait par dégagement de la chaleur de l'intérieur vers l'extérieur du récipient, il s'agit du phénomène thermique de convection contrairement au chauffage conventionnel (par conduction). C'est un mode de chauffage instantané en volume et non en surface dont la paroi externe du réacteur est plus froide que son milieu, (Fig.5) et inversement pour le cas du chauffage conventionnel par double enveloppe, plaque chauffante et flamme. Des surchauffes locales peuvent également se produire (Lucchesi, 2005).

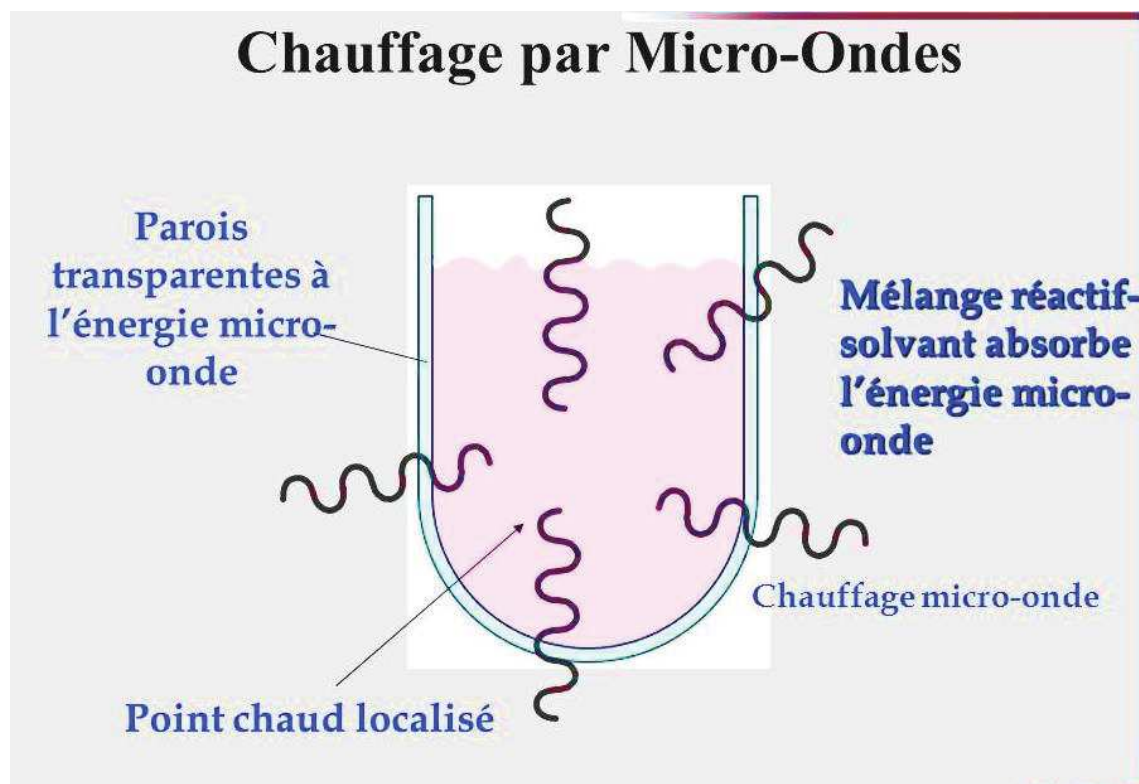


Figure 5 : Illustration du chauffage micro-onde

I.4. Interactions ondes - matière

Le mécanisme du chauffage diélectrique se produit sur les molécules ayant deux pôles extrêmes négatives et positives. Ces dipôles d'un milieu diélectrique se trouvent orientés au hasard sous l'effet de l'agitation thermique du milieu à l'état stable, mais sous l'effet d'un champ électrique continu, les molécules tendent à s'orienter dans la même direction du champ

et plus il n'est intense, moins l'agitation thermique qui tend à désorganiser l'alignement a d'importance dont il apparaît un moment dit dipolaire.

Sous l'effet d'un champ électrique alternatif de fréquence f , les dipôles s'orientent dans la direction du champ sur une demi-alternance, ou ils exercent une rotation dipolaire, ils se désorientent lorsque le champ s'annule et se réorientent dans l'autre sens pendant la seconde demi-alternance.

L'énergie électrique est convertie en énergie cinétique par la rotation des dipôles, elle est transformée partiellement en chaleur, ce sont les forces d'interactions entre molécules qui sont responsables de l'alignement des dipôles par rapport au champ électrique (les forces de liaison par pont hydrogène et les forces de liaisons de Van der Waals). Ces forces peuvent être assimilées à des forces de frottement internes qui existent dans les contacts solide-solide.

Elles s'opposent ainsi à la libre rotation des molécules qui fait naître le dégagement de chaleur. Si la fréquence du champ électrique est égale à la fréquence de relaxation, qui correspond à l'apparition d'un déphasage entre l'oscillation du champ électrique et celui des dipôles, la dissipation d'énergie par le produit peut être maximale. Les fréquences micro-ondes étant imposées, les molécules soumises à leur action ne tournent pas avec le changement alternatif du champ mais frissonnent (**Fig.6**).

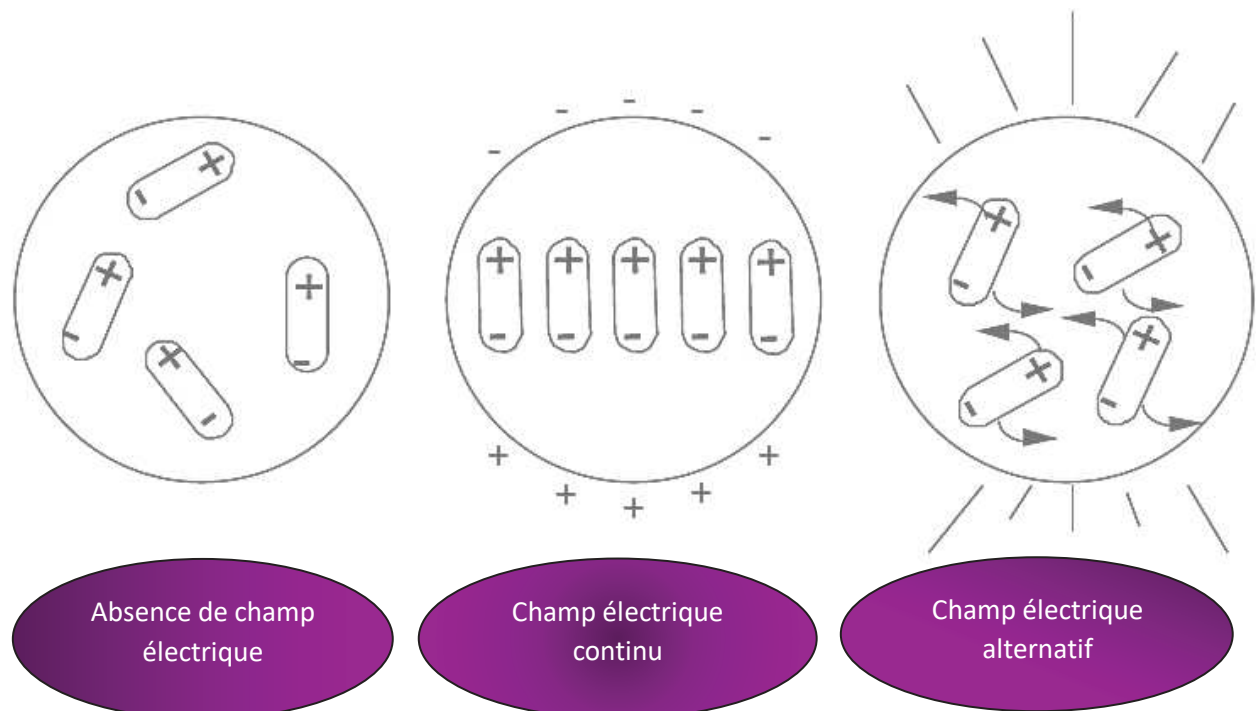


Figure 6 : Action du champ électrique

I.5. Spécificité du chauffage microonde

Il s'agit d'un chauffage diélectrique ou volumique possédant certaines spécificités :

Rapidité : des montées en température de plusieurs dizaines de degré peuvent être atteintes en quelques secondes.

Sélectivité et hétérogénéité : dans le cas d'un mélange de plusieurs constituants de caractéristiques diélectriques différentes, chaque constituant aura sa propre sensibilité aux microondes, cela induira une hétérogénéité en température.

Puissance : les systèmes disponibles permettent d'injecter des densités puissance locales très élevées.

Réactivité et peu d'inertie : le transfert d'énergie est quasi instantané ce qui confère une grande souplesse d'utilisation.

II. Application de la méthode aux différentes plantes médicinales et aromatiques

Dans ce procédé, la matrice végétale est en contact avec les micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques de condensation, refroidissement et décantation.

Ce procédé permet un gain de temps (temps d'extraction divisé par 5 à 10) et d'énergie (température plus basse) considérable. En guise d'exemple, l'extraction par micro-ondes de deux kilos de *Mentha piperita* permet d'obtenir environ 1% d'huile essentielle en 15 minutes alors que deux heures d'hydrodistillation sont nécessaires pour obtenir un rendement similaire à partir de la même masse de plante (Mengel *et al.*, 1993).

La composition de l'huile essentielle obtenue par ce procédé est bien souvent semblable à celle obtenue avec un procédé d'entraînement à la vapeur traditionnel. Toutefois, une plus grande proportion de composés oxygénés est généralement observée dans les huiles essentielles extraites par micro-ondes. Ceci est dû à la faible quantité d'eau présente dans le système et à la rapidité du processus de chauffage. Ainsi, les dégradations thermiques et hydrolytiques des composés oxygénés sont limitées (Bendahou *et al.*, 2007; Lucchesi *et al.*, 2007).

Cette technique présente donc beaucoup d'avantages : technologie verte, économie d'énergie et de temps, investissement initial réduit et dégradations thermiques et hydrolytiques minimisées (Mengal *et al.*, 1993; Lucchesi *et al.*, 2004). L'extraction par micro-ondes fait aujourd'hui l'objet de beaucoup d'études et ne cesse d'être améliorée (Chemat *et al.*, 2006 ; Flamini *et al.*, 2007; Lucchesi *et al.*, 2007).

III. Nouvelles méthodes d'extraction

III.1. Méthodes modernes à haut rendement

Pour surmonter les inconvénients des méthodes conventionnelles, de nombreuses méthodes d'extraction à haut rendement ont été appliquées pour l'extraction d'antioxydants (en particulier des composés phénoliques), telles que l'extraction assistée par ultrasons (EAU) (**Vilkhu *et al.*, 2008**), l'extraction assistée par micro-ondes (EAM) (**Proestos et Komaitis, 2008**), l'extraction assistée par champ pulsé (EACEP) (**Corrales *et al.*, 2008**), l'extraction accélérée de solvant (EAS) ou l'extraction liquide pressurisée (ELP), l'extraction de fluide supercritique (EFS-dioxyde de carbone) (**Tena *et al.*, 1997**) et l'extraction d'eau sous-critique (EESC).

Ces méthodes d'extraction permettent un temps d'extraction plus court, des rendements d'extraction plus élevés et une sélectivité pour les molécules cibles.

Chapitre 4 : Plantes médicinales, choix et usages

1. Plantes médicinales :

Reconnue comme le système thérapeutique le plus ancien du monde, la phytothérapie remonte aux toutes premières civilisations. De nos jours, la médecine par les plantes continue de se développer en tant que médecine alternative populaire et reste très appréciée et ce malgré les grands progrès technologiques de la médecine conventionnelle (allopathique), elle reste une médecine que l'on pratique à la maison. La médecine conventionnelle, telle que nous la connaissons, est excellente pour le traitement des maladies aiguës et arrive très souvent à soulager leurs symptômes.

Les plantes et les thérapies naturelles constituent des remèdes de choix pour entretenir le bien-être et traiter à la racine de problèmes de santé chroniques.

Cependant, toutes les deux sont d'efficaces systèmes thérapeutiques ayant prouvé leur action, mais elles se distinguent l'une de l'autre et s'emploient dans des situations différentes en restant parfaitement complémentaires.

2. Métabolites secondaires des plantes

Plusieurs types de métabolites secondaires sont produits par les plantes. Les exemples les plus remarquables sont les coumarines, les lignanes, les saponines stéroïdes, plusieurs classes d'alcaloïdes (stéroïde, tropane, pyrrolizidine et cinchona), glucosinolates, dérivés de cystéine S-substitués et les composés dérivés de la DOPA par clivage et recyclage de l'anneau aromatique. De même, les flavonoïdes, les stilbénoloïdes et les glycosides cyanogènes rentrent dans la composition des plantes. Des classes uniques de métabolites secondaires végétaux sont liés aux différences dans le métabolisme primaire vu leur provenance biogénétique pathologique liées à la formation de la paroi cellulaire de la plante. Inversement, d'autres classes (par exemple les toxines de polyéther) sont remarquablement absentes de plantes ou sont très rares (par exemple depsipeptides) (Paige Stout et Kubanek , 2010).

3. Utilisation des plantes en médecine traditionnelle

L'utilisation des plantes en médecine traditionnelle a été confirmée par plusieurs travaux scientifiques menés dans le domaine de l'ethnopharmacologie, ce sont souvent des plantes efficaces et quasiment dépourvues de toxicité.

L'ethnobotanique et l'ethnopharmacologie mettent en relation les savoirs ancestraux traditionnels et les connaissances scientifiques actuelles.

L'usage empirique des différentes préparations traditionnelles est donc extrêmement important pour une sélection efficace des plantes (Gurib-Fakim, 2006).

4. Critères de choix et de sélection d'une plante à intérêt :

4.1. Aspects chimiotaxonomiques

Les plantes appartenant aux mêmes familles et/ou poussant dans les mêmes biotopes sont susceptibles de synthétiser les mêmes substances et molécules chimiques. On fait appel dans ce cas à la chimiotaxonomie permettant de choisir des plantes proches de celle dans laquelle la substance a été détectée et étudiée (**Grayer et al.,1999**), si les substances sont particulièrement connues pour leur potentiel thérapeutique.

4.2. Apports de la littérature

Des enquêtes impliquant la connaissance, la pratique et l'utilisation des plantes par la population humaine, permettent de comprendre certains phénomènes intéressants et contribuent à la compréhension des facteurs qui modulent la sélection des plantes médicinales, tels que la disponibilité des ressources et l'efficacité qui ont été signalés comme étant importants pour la sélection (**Phillips et Gentry,1993 ; Stepp et Moerman,2001**) de deux façons :

(1) choisir des plantes qui se trouvent naturellement dans la végétation adjacente au groupe humain qui provient d'un pays ou d'un continent (comme Espèces indigènes).

(2) la sélection d'espèces d'autres pays ou continents en contact avec d'autres cultures (espèces exotiques) (**Stepp et Moerman, 2001 ; Van Andel et al., 2012**).

Cependant, il existe une autre idée, dans laquelle une culture particulière utilise des espèces exotiques pour diversifier son arsenal thérapeutique ou combler des lacunes thérapeutiques qui ne sont pas traitées par les plantes de la région. Cette hypothèse a été appelée l'Hypothèse de la diversification (**Alencar et al., 2010**).

4.3. Plantes médicinales étudiées

Sur la base des critères de choix des plantes médicinales cités ci-dessus, notre sélection s'est portée sur une plante médicinale, nommée : *Thapsia garganica* L. souvent répandue sur les hauteurs montagneuses algériennes et même dans quelques régions du Sahara. Elle est répandue par ces vertus et ces multiples utilisations dans la médecine traditionnelle algérienne. Dans ce qui suit, nous rapportons la description botanique, l'utilisation médicinale ainsi que les travaux antérieurs sur la plante.

Chapitre 5 : Les Apiacées, genre *Thapsia* et *Thapsia garganica* L.

Introduction

Thapsia est un petit genre de plantes vivaces herbacées dans la famille Apiaceae qui est largement distribué à travers la Méditerranée, du Portugal et du Maroc à la Grèce et à la Turquie. Les espèces *Thapsia* L., autrement connues sous le nom de carottes mortelles, ont été utilisées en médecine méditerranéenne depuis des milliers d'années. Hippocrate et Théophraste ont d'abord décrit les effets irritants de la peau et les utilisations médicinales de *Thapsia garganica* L. vers 300-400 avant JC. En 1597.

I. Genre *Thapsia* (*Thapsia* genus):

L'effet de *Thapsia* a été vivement décrit comme «si un homme se tient où le vent souffle de la plante, l'air endommage le visage, et tous les autres lieux nus qui peuvent être soumis à son explosion venimeuse et qualité toxique (Gerard,1597). Bien que cette description soit une exagération, le contact de la peau directe avec la plante peut entraîner une dermatite sous forme d'érythème, de petites ampoules et des démangeaisons. La résine des racines et des tiges de *T. garganica* a été utilisée comme un remède contre un certain nombre de maladies et maladies : stérilité féminine, maladies pulmonaires, catarrhe, fièvre, pneumonie et comme contre-irritant pour le soulagement des douleurs rhumatismales (Gerard,1597 ; Bellakhdar,1997 ; Abderrahim *et al.*,2013). En 1857, l'utilisation de *T. garganica* en Europe a été recommandée pour le traitement des maladies pulmonaires, catarrhe et douleurs rhumatismales, par l'application d'un plâtre médicinal contenant la résine racinaire (Bertherand, 1857). Actuellement, au Maroc *Thapsia spp.* sont toujours utilisés dans les Médecine (Abderrahim *et al.*,2013, Ouarghidi *et al.*,2012). En outre, *T. garganica* a été présenté dans plusieurs pharmacopées (Rasmussen, 1979).

I.1. Phylogénie de *Thapsia* L.

Thapsia est un petit genre de plantes vivaces herbacées dans la famille Apiaceae qui est largement distribué à travers la Méditerranée, du Portugal et du Maroc à la Grèce et à la Turquie. Le genre est actuellement mal défini, avec des erreurs fréquentes dans l'identification des espèces ou des conflits vues sur lesquelles les noms définissent quels membres du groupe. Ceci est particulièrement problématique dans le cas de la médecine traditionnelle, où le choix de la mauvaise plante peut conduire à l'intoxication les patients. Sur la base de l'analyse phylogénétique la plus récente de *Thapsia*, le genre comprend 14 espèces (Weitzel *et al.*,2014). Les révisions chimiotaxonomiques, cependant, sont toujours en cours et révèlent souvent de nouvelles relations intra ou interspécifiques (Bajaj, 1995).

I.2. Etude phytochimique du genre *Thapsia*:

Une isolation bioguide a donné une fraction avec des propriétés irritantes de la peau puissantes (**Rasmussen *et al.*,1978**). Les études spectroscopiques du principe actif ont révélé que le composé était un guaianolide hexaoxygéné (ne trouvant que chez le genre *Thapsia*), qui était appelé thapsigargine (1) (**Fig.7**) (**Christensen *et al.*,1980**)

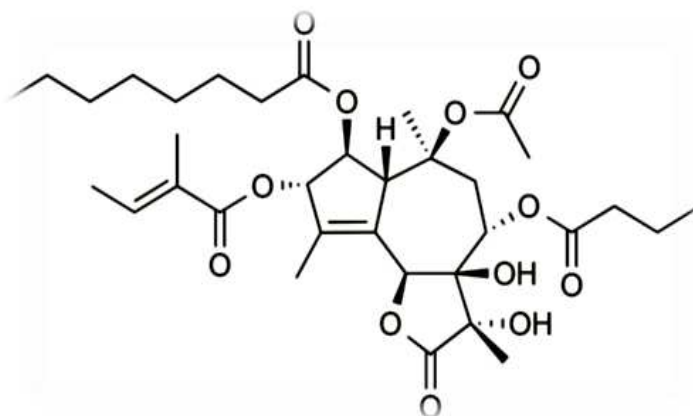


Figure 7 : Structure du principe actif : thapsigargine (Tg)

La configuration relative a été établie en résolvant la structure cristalline de l'époxyde cristallin (2) formé en traitant 1 avec du chlorure de thionyle (**schéma 1**) (**Christensen *et al.*,1982**). Cette conversion d'un diol vicinal en époxyde est une réaction très inhabituelle et seulement très peu de réaction analogue est décrite (**Holub *et al.*,1973**). Enfin, la configuration absolue a été résolue en profitant du couplage exciton (**Christensen *et al.*, 1985**).

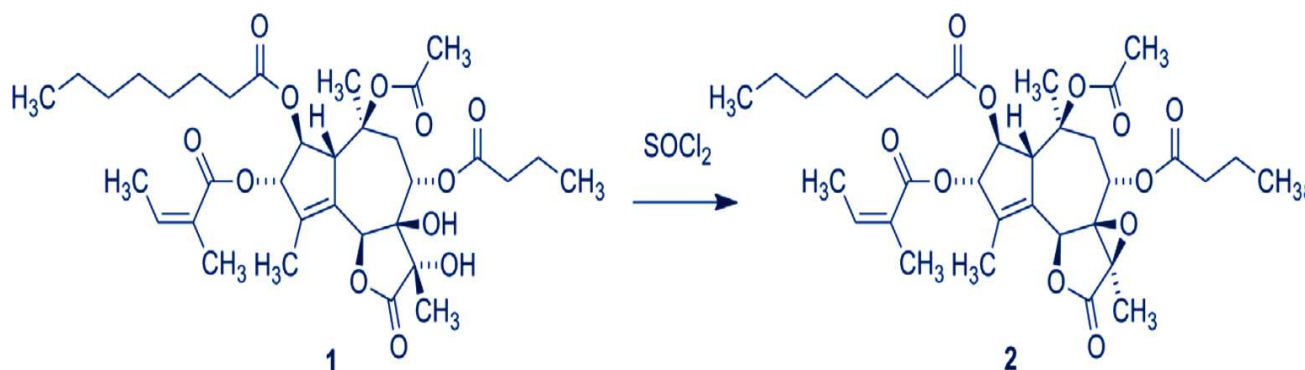
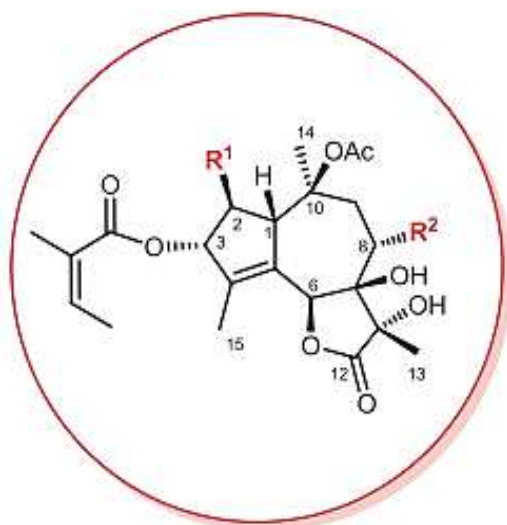


Schéma 1 : Conversion de thapsigargine (1) en thapsigargine époxyde (2)

L'étude phytochimique du genre *Thapsia* a révélé un certain nombre d'autres guaianolides hexaoxygénés [thapsigargicine (3), thapsitranstagan (4), thapsivillosine A-E (5-9), thapsivillosine G-K (10-14) et 2-acétoxytrilobolide (15)] (**Christensen *et al.*,1997**, **Harmatha *et al.*, 2013**) et en plus de guaianolides penta-oxygénés trilobolide (16), nortrilobolide (17) et thapsivillosine F (18)] (**Fig.8**) (**Christensen *et al.*,1997**).



	R ¹	R ²
thapsigargine (Tg)	O-Oct	O-But
thapsigarginine	O-Hex	O-But
thapsitranstagine	O-iVal	O-2-Me-But
thapsivillosine A	O-Ang	O-Sen
thapsivillosine B	O-Ang	O-2-Me-But
thapsivillosine C	O-Octanoyl	O-2-Me-But
thapsivillosine D	O-6-Me-Oct	O-Sen
thapsivillosine E	O-6-Me-Oct	O-2-Me-But
thapsivillosine F	H	O-Sen
thapsivillosine G	O-6-Me-Hept	O-2-Me-But
thapsivillosine H	O-Ang ou Sen	O-Ang ou Sen
thapsivillosine I	O-Ang	O-But
thapsivillosine J	O-iVal	O-But
thapsivillosine K	O-Sen	O-2-Me-But
thapsivillosine L	O-But	O-But
trilobolide	H	(S)-O-2-Me-But
nortrilobolide	H	O-But

Ang : angéloyl, But : butanoyl, Hex : hexanoyl,
Oct : octanoyl, Sen : sénéciroyl, Val : valéroyl

Figure 8 : Famille des thapsigargines

I.3. Sesquiterpènes lactones du *Thapsia* spp. : Thapsigargines (Fig.8)

I.3.1. Sesquiterpénoïdes en *Thapsia*

Les sesquiterpénoïdes sont répandus dans le genre *Thapsia* (Fraga, 2011), cependant, c'est thapsigargin et le groupe de composés similaires, les guaianolides, qui sont les plus intéressants. En raison de la toxicité de thapsigargin vers les mammifères, une fonction in planta devrait être la protection des plantes contre l'herbivore.

Les thapsigargines (17 composés à ce jour). La thapsigargine (Tg) en est la molécule phare, il s'agit d'une sesquiterpène lactone dont des dérivés pro-drogues sont utilisés en phase I pour le traitement du cancer de la prostate (Fig.9) (Christensen *et al.*, 2009).

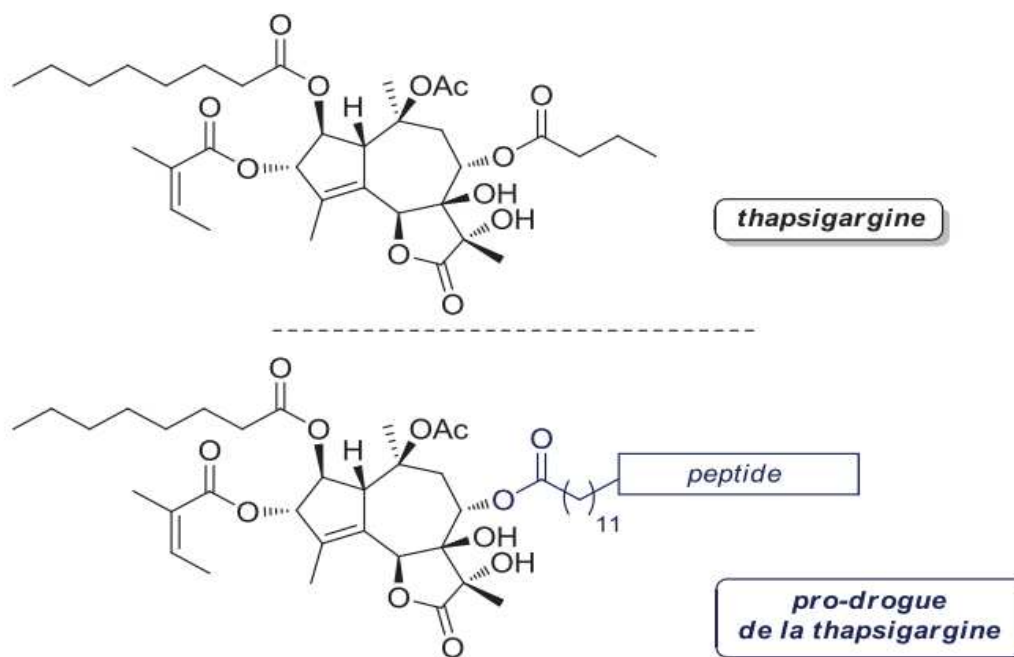


Figure 9 : Thapsigargin et ses pro-drogues. [Cette pro-drogue, référencée sous le nom G-202, est développée par l'entreprise GenSpera (Texas, USA)]

I.3.2. Thapsigargin

La thapsigargin (Tg) fait partie d'une famille du même nom comprenant au moins dix-sept composés ayant une structure tricyclique 5-7-5. Ces sesquiterpènes lactoniques ne diffèrent que par la nature des esters en position 2 et 8, à l'exception du trilobolide, du nortrilobolide et de la thapsivillosine F qui ne comportent pas de fonction oxygénée en C2.

Les terpénoïdes peuvent être divisés en plusieurs familles basées sur le nombre d'unités isoprénoïdes qui les compose.

La concentration de la thapsigargin varie même au sein des espèces, apparemment dépendante de sa localité., dont des études sur des plantes sauvages de *T. garganica* ont montré qu'elles ont une concentration de thapsigargin de 0,2% -1,2% du poids sec de racines et de 0,7% à 1,5% du poids sec des fruits mûrs, tandis que les tiges et les feuilles séchées contiennent une concentration de 0,1% -0,5% et 0,1% respectivement (Smitt *et al.*, 1995).

I.4. Thapsigargin et la biosynthèse de guaianolide dans *Thapsia*

Les terpénoïdes sont la plus grande classe de petits produits naturels et sont structurellement très diversifiés, métabolites du métabolisme général et spécialisé (Simonsen *et al.*, 2013). Dans les terpénoïdes, les sesquiterpénoïdes (C15) sont un grand groupe de métabolites spécialisés.

I.4.1. Biosynthèse de thapsigargins

Une terpène synthase, TgTPS2, trouvée dans les banques de transcriptomes (SRX096991, il n'y a pas de génome séquence disponible) de racines et de fruits de *T. garganica* a été trouvé pour convertir FPP en kunzeaol. Kunzeaol est un candidat probable pour la première étape de biosynthèse vers thapsigargine (**Schéma 2**) (**Pickel et al.,2012**). Le groupe hydroxyle en position C6 du kunzeaol en fait un bon substrat pour la formation ultérieure du lactone. On pense que les étapes suivantes sont semblables à celles de la biosynthèse costunolide, la formation du cycle lactone est suivie par la formation du squelette du guaiène (**Liu et al.,2011**, **Ikezawa et al.,2011**). Les enzymes cytochromes familiaux P450 sont des candidats de choix pour participer à la formation d'un cycle lactone. Une triple hydroxylation sur C12, comme on le voit dans costunolide, conduirait à la formation d'un groupe acide qui rentre en réaction spontanée avec l'OH sur C6 et former un cycle lactone. Les cytochromes P450 pourraient également catalyser la formation de noyaux guaiène par une époxydation de la double liaison C1-10 ; Cependant, c'est encore être élucidé.

Un certain nombre d'hydroxylations sont nécessaires sur les positions C2, C3, C7, C8, C10 et C11, suivies de la décoration de la structure centrale par addition de groupes acyle. Comme la plupart des enzymes impliquées dans cette voie sont supposées être des cytochromes P450, suffisamment d'oxygène et de NADPH sont cruciaux pour l'efficacité de la biosynthèse.

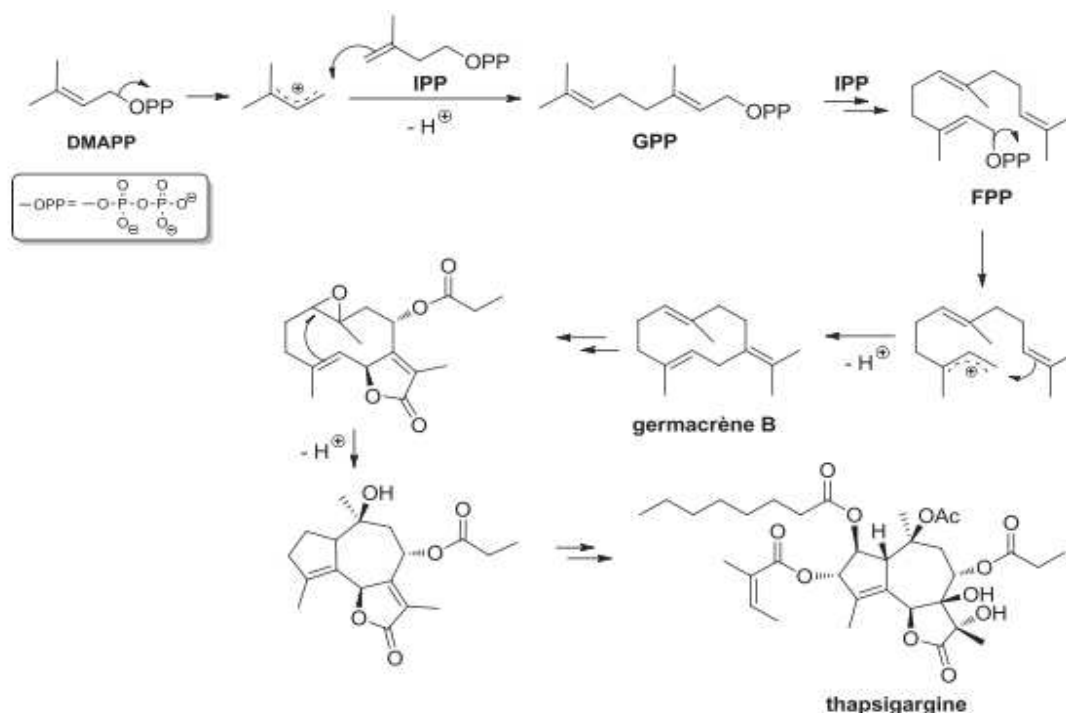


Schéma 2 : Biosynthèse de la Tg (**Drew et al., 2009** ; **Schall et Reiser, 2008**)

I.5. Plateformes de production de thapsigargin

I.5.1. Production agricole

La demande de thapsigargin est croissante compte tenu de son application médicale potentielle en tant que chimiothérapeutique promédicament (**Genspera Genspera, 2015**). Actuellement, tous les thapsigargin disponibles dans le commerce sont obtenus à partir des fruits et racines de populations sauvages de *T. garganica* (**Makunga et al.,2003**) ; **Christensen et al.,2009**).

Cette culture s'est révélée compliquée car la plante est difficile à germer de semences et de maintenir en serre (**Makunga et al.,2003** , **Jäger et al.,1993a**). Vu la fragilité des racines, les plantules doivent être faites avec soin. ThapsIbiza, une société espagnole basée à Ibiza a commencé une petite production de plantes *T. garganica*. Récemment, une méthode d'extraction de grandes quantités de thapsigargin a été publiée permettant une production à grande échelle (**Ollivier et al.,2013**).

I.5.2. Cultures d'organes pour la production de la thapsigargin

La micropropagation constitue une source alternative pour la production de la thapsigargin (**Makunga et al.,2006**). **Jäger et al.** L'établissement de *T. garganica* dans des cultures in vitro, dans le but de produire la thapsigargin (**Jäger et al.,1993b**). Le fait que la thapsigargin soit dans la résine présente dans les canaux secrets spécifiques de la plante, peut indiquer la différenciation pour la synthèse et le stockage des composés bioactifs. (**Rasmussen, 1979**).

La fréquence d'enracinement a été notée à 60%, après 10 jours lorsque les racines ont été immergées dans un milieu liquide MS avec un régulateur de croissance (**Makunga et al.,2006**). Par conséquent, les racines poilues transgéniques sont potentiellement une source alternative de produire la thapsigargin (**Makunga et al.,2005** ; **Fett-Neto, 2010**).

I.5.3. Production dans hôtes hétérologues

Il a été également montré que *Physcomitrella patens* était un producteur prometteur de sesquiterpénoïdes et Diterpénoïdes (**Pan, 2014**; **Anterola et al.,2009**), et pourrait servir bien comme un hôte de production de la thapsigargin. *P. patens* a plusieurs avantages puisqu'il peut être cultivé dans des cultures stériles et sur un simple milieu liquide ou solide inorganique sans phytohormones, vitamines ou une source de carbone (**Ashton et Cove, 1977**).

I.5.4. Synthèse chimique de la thapsigargine

L'activité biologique de la thapsigargine en fait un candidat médicamenteux viable et cela a conduit à des efforts pour la synthétiser chimiquement et de nombreux analogues (**Christensen et al.,1993**; **Søhoel et al.,2005** ; **Andrews et al.,2007** ; **Marín-Barrios et al.,2014** ; **Kaliappan et Nandurdikar,2005**). Malgré la synthèse réussie de la thapsigargine, ainsi que d'autres composés bioactifs avec des structures chimiques complexes, Une voie de synthèse réalisable vers ces composés de grande valeur reste un défi. Les tentatives de squelette guaianolide de la thapsigargine ont été commencé, suivies de la première synthèse totale de thapsigargin a été rapporté (**Ley et al.,2004** ; **Ball et al.,2007**). Tap et coll. ont développé ainsi le système cyclique bicycledécadiénone fonctionnalisé de la thapsigargine à travers un système *Pauson-Khand Annulation* (**Tap et al.,2012**).

I.6. Pharmacologie du thapsigargin :

I.6.1. Effet pharmacologique de thapsigargin :

La thapsigargine, comme d'autres lactones sesquiterpénoïdes en général, est connue pour son activité biologique.

L'activité pharmacologique principale et la plus importante de la thapsigargine est sa puissante inhibition irréversible de la pompe SERCA, conduisant à des niveaux cytoplasmiques élevés de Ca^{2+} qui induisent une apoptose. Cet effet est important dans des concentrations sous-nanomolaires (**Sagara et Inesi,1991**).

Une expansion des études a révélé que ce composé provoque, de plus de l'histamine, la libération d'autres médiateurs (**Patkar et al.,1979**) d'un large spectre de cellules impliquées dans la réponse immunologique (**Ali et al., 1985** ; **Kmonickova et al., 2008**) et avait même un effet sur les cellules musculaires (**Mikkelsen et Thastrup,1988**).

I.6.2. Introduction dans la médecine traditionnelle à la lutte contre le cancer

Fujiki a suggéré que la thapsigargine comme les phorbols était un promoteur tumoral (**Hakii et al.,1986**). L'administration systémique de ce dernier a révélé une valeur de DL de 0,8 mg / kg chez la souris (**Denmeade et al.,2003**). Une corrélation positive entre la lipophilie de thapsigargine et ses effets sur les mastocytes de rats a été démontrée (**Norup et al.,1986**).

Une structure de rayons X du complexe SERCA et thapsigargine a également fourni des informations détaillées du site de liaison ; qui a permis la conception d'un promédicament ciblé avec la thapsigargine comme composant actif (**Søhoel et al.,2006**), (**Fig.10**).

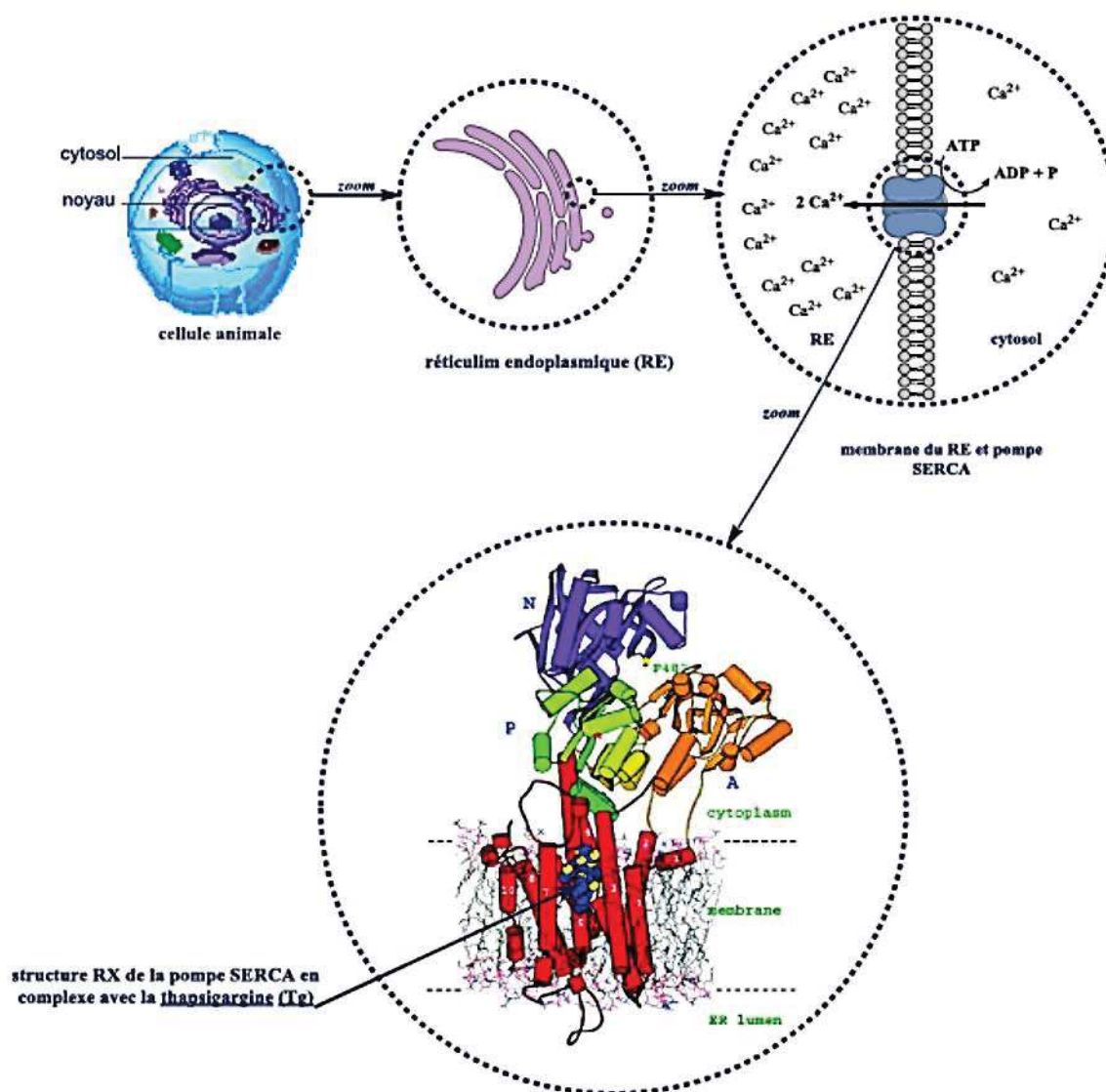


Figure 10 : Localisation des pompes SERCA.

Le promédicament est conçu de telle sorte qu'il ne soit activé que par des cellules cancéreuses, entraînant une apoptose dans la tumeur (Doan *et al.*, 2014). L'affinité de la thapsigargine à SERCA est principalement due aux interactions lipophiles entre le C₂ octanoyl, le C₃-Angeloyl- et le C₈ butanoyl et les hélices alpha de SERCA. Les interactions des chaînes latérales avec SERCA ont été confirmées en utilisant des analogues sans chaînes latérales ou stéréochimie inversée (Søhoel *et al.*, 2006). Cela a conduit à une compréhension approfondie de l'importance des chaînes latérales de la thapsigargine (Denmeade *et al.*, 2012).

La thapsigargine n'est donc pas appropriée pour l'utilisation comme médicament non modifié, une stratégie de développer un promédicament est nécessaire dont le ciblage efficace des tumeurs a été confirmé (Chandran *et al.*, 2007). Cela a fait l'objet d'étude sur le cancer de la prostate in vivo chez des souris nues (Brennen *et al.*, 2012). Ce qui entraîne par la suite, le médicament G-115 et au développement de G202 ou Mipsagargin (Mahalingam *et al.*, 2013).

Conclusion

La concentration sur la production de la thapsigargine médicaments à venir se poursuivra. Les derniers développements suggèrent que le besoin futur sera atteint par les cultures de tissus végétaux ainsi que par les plantes cultivées sur Ibiza. Les approches utilisant la semi-synthèse ou la synthèse totale sont actuellement loin d'être économiquement faisable. Néanmoins, les recherches futures pourraient fournir de nouvelles stratégies pour de telles approches et ouvrir une utilisation prolongée de thapsigargins. De nouveaux promédicaments sont actuellement mis au point pour certains types de cancer, et dans l'ensemble, l'utilisation de la thapsigargine comme médicament et composé chimique augmentera dans la prochaine décennie.

Thapsia garganica L.

II. Plante étudiée : *Thapsia garganica L.*

II.1. Taxonavigation

Taxonavigation: **Apiales**

Famille: **Apiaceae**

Subfamille: **Apioideae**

Tribus: **Scandiceae**

Subtribus: **Daucinae**

Genre: **Thapsia**

Espèce: *Thapsia garganica*

II.2. Nomenclature :

Nom commun : Thapsia

Arabe : Bou-nafa

Nom scientifique : *Thapsia garganica L.*, Mant. Pl. 57. 1767.

Noms vernaculaires : • (A) Bou-nafit, Dryas

• (B) Adbib, Adrias, Atharghis, Hadriegs, Tafsia, Toufelt

• (E) Drias plant

• (F) Faux fenouil, Thapsia du mont Gargan *

II.3. Description Botanique

Thapsia garganica L. est une herbe robuste de 1 à 2 mètres, vivace, à racines pivotantes et vigoureuses, les parties aériennes sont glabres, les feuilles lisses, finement découpées en étroites lanières lancéolés. Les ombelles jaunes atteignent 25 cm de diamètre (**Fig.11**), elles sont nues à la base (**Quezel et Santa (1962-1963)**). Le fruit de grande taille (15-25×10-15mm) est un akène double dont les deux méricarpes ont les cotes secondaires, latérales, fortement dilatées en ailes membraneuses. Toute la plante renferme une résine rubéfiante, localisée dans les nombreux canaux sécréteurs.



Figure 11 : Présentation de la plante *Thapsia garganica L.*

II.3.1. Biotope et distribution géographique

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 du nord en passant par toutes les formes d'argiles sèches ou gorgées d'eau (Merad et Hammiche, 1992). Le plus recherché était celui des montagnes de Kabylie et des Aurès. Bou nafa: nom arabe qui désigne la racine comme « le père de l'efficacité », « le père de la santé ». C'est une vraie panacée. *Thapsia villosa* L. n'aurait que peu d'activité. Déjà connue d'Hippocrate, Dioscoride, Théophraste, Pline et Galien, la plante tire son nom de l'île de Thapsos où elle fut découverte et du promontoire de Gargano.

II.3.2. Identification botanique

- **Fleur** : les ombelles sont jaunes et de grande taille (Fig.12).



Figure 12 : Description des fleurs en ombelles de *T.garganica* L.

- **Feuille** : les feuilles sont glabres, découpées en étroites lanières filiformes comme celles du fenouil ; leur pétiole est dilaté en gaine à la partie inférieure (Fig.13).



Figure 13 : Description des feuilles de *T.garganica* L.

• **Fruit** : il est caractéristique (**Fig.14**); c'est un akène de grande taille (25 mm sur 15 mm) forme de deux méricarpes accolés ; chaque méricarpe possède une face ventrale plane, trois côtes dorsales, peu proéminentes et deux côtes latérales, fortement dilatées en ailes membraneuses, brillantes, plissées horizontalement, de couleur jaune paille, à bords ondulés, échancrés aux deux extrémités. Sa saveur piquante et caustique est caractéristique.



Figure 14: Description des graines de *T.garganica* L. après sa maturation (mois juillet-Août)

II.3.3. Identification chimique

Une simple et rapide technique HPLC-VV a permis la séparation et la détermination des principaux composés (thapsigargine et dérivés) de *Thapsia garganica* (**Merad, 1973**). Dont un mélange [méthanol-eau (83:17)] était employé comme phase mobile. Par la suite un accouplage de technique HPLC à un détecteur NMR (HPLC-SPE-NMR), a assuré l'identification de 9 produits isolés à partir d'un complexe de lactones sesquiterpeniques et de phenylpropanoïdes estérifiés d'un extrait éthanolique de fruits de *T.garganica* (**Jager et al.,1993**). Lors d'une étude d'évaluation établie par Zervakis et son équipe (2001), des caractères morphologiques et écologiques de *T.garganica* sont décrites (**Tableau1**).

Tableau 1 : Résumé des caractères morphologiques les plus distinctifs et des caractéristiques écologiques de *T.garganica* selon l'étude **Zervakis et al., 2001**. Lors d'évaluation la systématique et la diversité des taxons européens *Pleurotus* associées à des ombellifères

Caractéristiques	<i>Thapsia garganica</i>
Taille du Pilé (cm)	2-10
Couleur de Pileus	Brun foncé à brun chaud
Surface du Pileus	Squamules dispersées
Cuticule	Mince, avec des pigments, velouté, pruinose
Lamelles	Profondément décurrentes, anastomoses blanc grisâtre à stipe
Position Stipe	Central
Taille de Stipe (cm)	3-5 × 1-3
Spores (µm)	9-8-13-6 × 4-6-7-3
Basidia (µm)	32-54 × 6-9
Cheilocystidia (µm)	Rare
Habitude	Avril-mai, principalement seul
Habitat	Pâturages, sur calcaire, mélangés avec <i>Eryngium</i>
Altitude (m)	1000-1200
Taux de croissance	Moyen
Virulence*	ND
Chromosome no.‡	ND

* Données de Hilber (1982) (ND, pas de données).

‡ Données de Slezec (1984) (ND, pas de données).

II.4 Intérêts de la plante

II.4.1. Usages traditionnels

L'écorce de racine trouve encore quelques emplois en médecine traditionnelle maghrébine, pour traiter la stérilité féminine, les douleurs rhumatismales, les entorses et surtout, pour les maladies pulmonaires graves.

La racine fraîche est enfouie dans des cendres chaudes, est appliquée comme cataplasme sur le thorax préalablement enduit d'huile d'olive. (**Hammiche, 1991**), elle est aussi chauffée dans de l'huile d'olive, est utilisée pour traiter la stérilité féminine. Elle calmerait, par contact direct, les algies dentaires.

En décoction, elle est utilisée dans les affections pulmonaires courantes comme purgative drastique et emménagogue.

Les feuilles fraîches, chauffées et trempées dans d'huile d'olive, sont appliquées en cataplasme afin de calmer les douleurs articulaires.

En Kabylie, dès l'arrivée du printemps, il est d'usage de faire une cure « dépurative » en préparant un couscous à base de *Thapsia* (**Hammiche, 1991**).

Les effets toxiques des parties de la plante dans le fourrage sont connus depuis des siècles (**Perrot, 1943**). Malgré l'ancienne connaissance des effets de la plante, la chimie et la pharmacologie n'étaient pas comprises.

II.4.2. Utilisations thérapeutiques

La résine figurait, sous forme d'extrait mou, à la pharmacopée française 1937 et servait à préparer divers papiers révulsifs, sparadraps et topiques utilisés en usage externe, n'est plus utilisée depuis longtemps.

La plante fait l'objet d'investigations dans le traitement du cancer de la prostate, les données précliniques semblent prometteuses, une rémission dans l'évolution de la tumeur apparaît avec une toxicité minimale (**Isaacs, 2005**).

Les chercheurs ont conçu, à partir de la thapsigargine, l'un des principes du thapsia, une pro-drogue appelée G202. La G202 est hydrolysée par une carboxy-peptidase membranaire, spécifique des cellules cancéreuses prostatiques ; cette hydrolyse active la G202 qui inhibe la pompe SERCA ce qui induit la mort de ces cellules (**Denmeade et al., 2012**). La présence de lactones sesquiterpéniques chez *T.garganica*, a mis en place ces derniers intérêts médicaux vu leur activité cytotoxique, antiprotozoaire et apoptotique antimicrobienne ; **Elmezogi et al., (2012)** ont également affirmé l'activité anti-inflammatoire des extraits méthanoliques des parties aériennes de *T.garganica* en utilisant le modèle d'œdème de la patte de souris induit par la carragénine (**Ahmed et al., 2005**).

➤ **Traitement de la toux à travers la pharmacopée traditionnelle kabyle**

Toutes ses parties sont toxiques et irritantes, particulièrement la racine dont la partie externe renferme une résine très agressive. Sa manipulation doit s'effectuer avec beaucoup de précautions et ses emplois sont limités : c'est un peu un dernier recours pour traiter la bronchite aiguë et la pneumonie (**Hammiche, 2015**).

II.5. Toxicité de *T.garganica*

II.5.1. Parties et principes toxiques

Toute la plante est toxique par sa résine, jaune ou légèrement rougeâtre, rubéfiante et vésicante, particulièrement abondante dans l'écorce de la racine. Elle est très toxique et contient un poison (**Bellakhdar, 1997**)

On y a caractérisé deux substances histamino-libératrices, des lactones sesquiterpéniques: thapsigargine et thapsigarginine ainsi que des triesters de lactones sesquiterpéniques ayant des structures inhabituelles (**Rasmussen et al., 1978**).

La thapsigargine, guaianolide hexaoxygène (Falsone *et al.*, 1986), mobilise le calcium intracellulaire selon des modalités très particulières, en inhibant la Ca⁺⁺ ATPase (SERCA) du réticulum endoplasmique [Christensen *et al.*, 1997 ; Thastrup *et al.*, 1990]. Dans le fruit, quatre phénylpropanotdes et un analogue de la thapsigargine ont été mis en évidence par spectroscopie; toutes ces substances ont développé une activité cytotoxique (Wrzosek *et al.*, 1993). Le fruit contiendrait une fraction lipidique riche en acide pétroselinique qui est une matière première recherchée (Liu *et al.*, 2006).

II.5.2. Un angioedème de topographie bilatérale suite au contact avec *T.garganica*

La plante est réputée de provoquer des réactions cutanées à type d'eczéma, de dermite d'irritation, de réactions anaphylactiques à types d'urticaire aiguë ou d'angioedème histaminique aigu médié par les IgE (Boudghene et Amrani 2015) et dernièrement des cas de pustuloses exanthématiques aiguës ont été rapportés.

II.5.3. Etude de la toxicité de *Thapsia garganica* in vivo

Quelques heures après l'ingestion d'une infusion à partir des différentes parties de *Thapsia garganica* par les souris, certains paramètres sanguins ont été estimés, à savoir des enzymes hépatiques telles que : les transaminases glutamique oxaloacétiques (TGO), la transaminase glutamate pyruvate (TGP) ; la phosphatase alcaline, des paramètres sanguins telles que l'urée, la créatine, la bilirubine totale, la bilirubine directe et indirecte (Bedjou *et al.*, 2011).

II.5.4. Circonstances de l'intoxication

Il s'agit, surtout, d'intoxications animales. Elles ne sont pas rares, soit que des fruits et des feuilles soient mêlées au fourrage (Avato *et al.*, 2001), soit que les troupeaux nomadisent loin de leur aire naturelle de pâturages en provoquant une gastro-entérite (Perrot, 1943-1944) ; dont les signes sont, une importante sécrétion salivaire - « thafes » - puis des troubles de la vision, des désordres nerveux, des troubles digestifs suivis, dans les cas graves, de mort. (Hammiche *et al.*, 1993). Les intoxications humaines sont toutes dues aux utilisations traditionnelles mal maîtrisées.

II.5.5. Symptomatologie

Sa toxicité est connue et seules des personnes averties la manipulent avec beaucoup de précautions pour éviter les ophtalmies et des œdèmes de la face, type œdème de Quincke (Bellakhdar, 1978).

Sur la peau, l'action révulsive se manifeste d'abord par une rubéfaction violente avec forte éruption de vésicules et s'accompagne d'un œdème sous-jacent et de prurit intense qui peut

aboutir à la formation de pustules. On note, parfois, de la fièvre. L'inflammation et le prurit évoluent, en 3 à 4 jours, vers un dessèchement de l'épiderme qui se desquame sans laisser de cicatrices (Avato, 2001).

L'ingestion, chez l'homme se traduit à faible dose, par de la diarrhée parfois des vomissements (Bellakhdar, 1978). Le même auteur rapporte, en 1991, un cas d'intoxication chez une fillette de 5 ans qui subtilise et mâchonne un fragment de racine destinée à la préparation d'un remède abortif ; elle est hospitalisée avec un érythème de la face, un œdème buccal et oculaire et une température à 40°C.

II.5.6. Traitement

Symptomatique, il vise à débarrasser l'organisme du toxique par des vomissements provoqués ou par un lavage gastrique. L'administration de pansements gastriques et d'antihistaminiques peut être préconisée. Des préparations topiques calmantes et un « talcage » abondant apaisent le prurit désagréable.

Dans les organismes eucaryotes, les thapsigargines (Tg) de *T.garganica* sont devenues largement utilisées comme outils pharmacologiques car ce sont des inhibiteurs spécifiques de la SERCA. Tg a une affinité plus élevée pour SERCA que BHQ, inhibant la pompe de manière irréversible à des concentrations nanomolaires. La Tg induit la libération de Ca^{2+} à partir de réserves intracellulaires sensibles à l'inositol-1,4,5-trisphosphate, en bloquant la pompe SERCA dans un état E2 à faible teneur en Ca^{2+} (Sagara *et al.*, 1992). Thapsigargin est devenu un outil indispensable dans la physiologie cellulaire et dans l'étude de l'homéostasie du calcium.

Une nouvelle étude a indiqué que thapsigargine, spécifiquement à 10 nM, induit un stress réticulaire endoplasmique (ER) dans les cellules musculaires lisses vasculaires humaines VSMCs (Shukla *et al.*, 2013), qui favorise la phosphorylation de la protéine kinase R (PKR) et facteur d'initiation eucaryote 2α (eIF2 α) qui à son tour inhibe la réplication cellulaire (Pérez-Gordonés *et al.*, 2015); confirmant que les dérivés Tg ou Tg pourraient être utilisés comme médicaments anti-*Trypanosoma evansi*.

Très récemment, un ciblage sélectif de la prostate a été réalisé par une prodrogue de la Tg (G202); ce composé, consistant en un peptide spécifique de la PSMA (« prostate-specific membrane antigen ») couplé à la Tg est actuellement en essais cliniques phase I.

Chapitre 6 : HS-SPME : Procédé d'identification chimique

Introduction

La micro-extraction sur phase solide (SPME) a été décrite pour la première fois dans la littérature par Arthur et Pawliszyn en 1990 (Arthur *et al.*, 1990). Lors des premières expériences, les fibres optiques d'une phase stationnaire liquide ou solide étaient mises en contact avec un échantillon aqueux pour extraire des composés organiques volatils. Les premières études décrites mettaient en œuvre des fibres avec un revêtement de type polymère : PDMS (Polydimethylsiloxane) pour les composés apolaires tels que le benzène (Arthur *et al.*, 1992 ; Louch *et al.*, 1992) ou polyacrylate pour les composés polaires tels que les phénols (Buchholz *et al.*, 1993).

I. Description de la technique SPME

I.1.Principe

La Micro-Extraction en Phase Solide (SPME) est une technique de concentration ne nécessitant pas de solvant, où la préparation de l'échantillon est très souvent limitée à son prélèvement. Elle repose sur la partition des composés d'intérêt entre la matrice de l'échantillon et une phase polymérique spécifique supportée par une fibre en silice (Dumoulin et Barthas, 2006). Le principe de concentration par SPME repose sur l'adsorption des composés chimiques sur une phase polymérique supportée par une fibre en silice (Fig.15). En fonction de la tension de vapeur des composés recherchés, l'adsorption sur la fibre SPME peut être conduite soit en mode espace de tête (Head space) (HS-SPME), soit en mode immersion (DI-SPME).

- **En mode head space (HS-SPME)** : la fibre adsorbe les analytes d'intérêts dans la phase gazeuse située au-dessus de la matrice liquide ou solide. La tendance pour un composé de passer en phase gazeuse est déterminée par la constante de partage K :

$$K = C_c/C_g$$

Avec :

C_c , la concentration de l'analyte dans la phase condensée (la matrice de l'échantillon) ;

C_g , la concentration dans la phase gazeuse (l'espace de tête).

Plus K est petit, plus le composé se retrouve dans la phase gazeuse et meilleure est l'analyse (Kaiser, 2007 ; Snow, 2002).

- **En mode immersion (DI-SPME)** : la fibre est plongée dans la matrice liquide à analyser (Fig.16), (Dumoulin *et al.*, 2014).

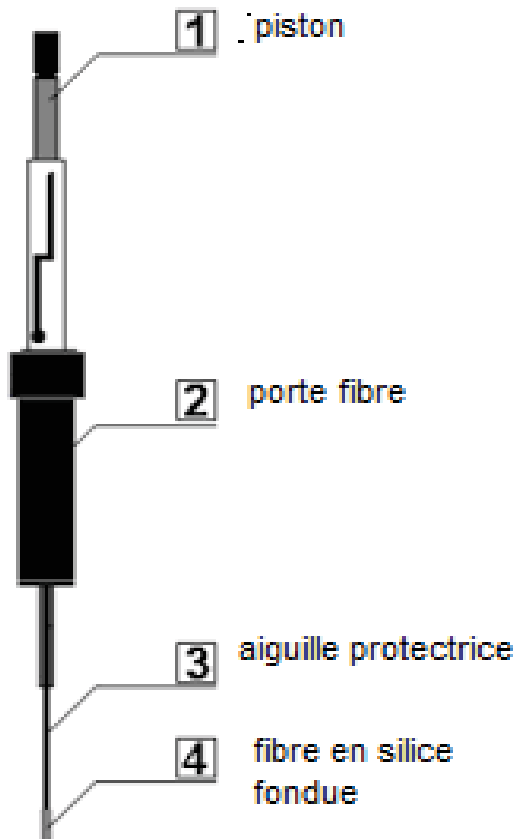


Figure 15 : Description du dispositif SPME adaptable au chromatographe en phase gazeuse et chromatographe en phase gazeuse couplé au spectromètre de masse.

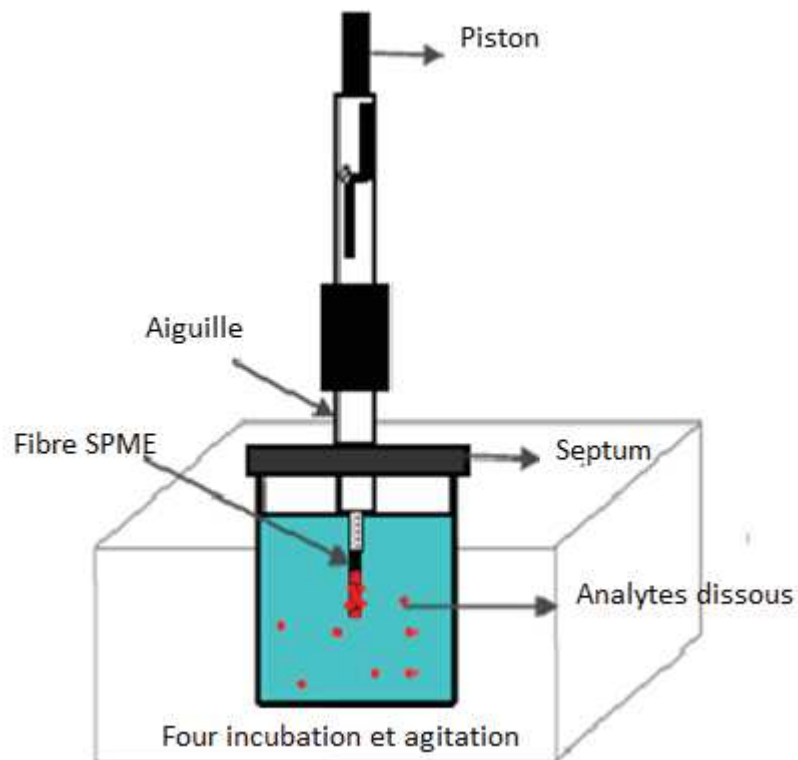


Figure 16 : Présentation de l'extraction par SPME en mode immersion direct (DI-immersion)

La SPME est une technique qui permet le traitement d'échantillons de toutes natures (solide, liquide, gazeux) et trouve de très nombreuses applications dans des domaines aussi variés que l'environnement, la pharmacie ou l'agroalimentaire. Enfin, la technique SPME peut être utilisée aussi bien en chromatographie gazeuse que liquide (**Dumoulin et al., 2014**). Le procédé a très rapidement évolué grâce à la mise au point d'une seringue de type Hamilton 7000 modifiée dont l'extrémité de l'aiguille comporte une fibre recouverte :

- Soit d'une phase solide constituée de polymère (PDMS, polyacrylate ou carbowax) dans le cas d'études de phases liquides.
- Soit d'une phase mixte en DVB, CW-DVB ou carboxen-PDMS. Dans ce cas, des microsphères poreuses sont immobilisées sur un film liquide.

II. Paramètres influençant l'extraction SPME

L'efficacité de la technique SPME dépend principalement de la quantité d'analytes qu'il est possible de concentrer sur la fibre. La répartition des composés à analyser entre la matrice de l'échantillon, l'espace de tête et la fibre est fonction de plusieurs paramètres physico-chimiques (**Betancourt, 2008**), dont les plus importants sont :

• La nature de la phase polymérique appliquée sur la fibre

La fibre est choisie en fonction du poids moléculaire et de la polarité des composés. D'une façon générale, la nature de la fibre va sélectionner la nature des analytes et son diamètre va sélectionner sa masse molaire (plus le diamètre est faible, plus les composés extraits auront majoritairement une grande masse molaire). Une fibre polaire peut extraire des produits polaires tels que les phénols et les acides carboxyliques. Différents polymères de revêtements de fibres, permettant de piéger plusieurs types d'analytes, sont commercialement disponibles. Il s'agit notamment du polydiméthyl siloxane (PDMS : revêtement apolaire) et des revêtements plus polaires tels que les copolymères PDMS-divinylbenzène (DVB), les carbowax (CW)-PMDS ou DVB, les carboxen (CAR)-PMDS ou DVB et les polyacrylates (PA) (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Fibres de la SPME commercialement disponibles (d'après Vas et Vékey, 2004).

Nature du revêtement	Épaisseur de film (µm)	Polarité	Température opératoire maximale (°C)	Technique	Analytes
PDMS	100	Apolaire	280	GC-HPLC	Volatils
PDMS	30	Apolaire	280	GC-HPLC	Apolaires semi-volatils
PDMS	7	Apolaire	340	GC-HPLC	Apolaires semi-volatils
PDMS-DVB	65	Bipolaire	270	GC	Polaires volatils
PDMS-DVB	60	Bipolaire	270	HPLC	Usage général
PDMS-DVB	65	Bipolaire	270	GC	Polaires volatils
PA	85	Polaire	320	GC-HPLC	Polaires semi-volatils
CAR-PDMS	75	Bipolaire	320	GC	Gaz et volatils
CAR-PDMS	85	Bipolaire	320	GC	Gaz et volatils
CW-DVB	65	Polaire	265	GC	Analytes polaires (alcools)
CW-DVB	70	Polaire	265	GC	Analytes polaires (alcools)
CW-TPR	50	Polaire	240	HPLC	Tensioactifs
DVB-PDMS-CAR	50/30	Bipolaire	270	GC	Odeurs et saveurs

• **La température** : La température a une influence sur la pression de vapeur des composés donc sur la distribution entre la phase liquide et la phase gazeuse et la phase gazeuse et la phase solide (fibre). Le fait de chauffer l'échantillon au cours de l'extraction permet d'atteindre l'équilibre plus rapidement grâce à la mobilité accrue des composés par agitation thermique.

• **Le temps de contact** : le temps de contact entre la fibre et l'échantillon peut varier de quelques minutes à plusieurs heures selon la nature et la quantité des composés ainsi que de la sensibilité souhaitée. Le temps d'équilibre est limité par la vitesse de transfert de l'analyte à travers la couche statique à l'interface entre la solution et la fibre (**Lord et Pawliszyn, 2000**).

• **Le PH** : en présence d'eau dans différentes conditions de pH et de force ionique, les composés peuvent varier leur solubilité ainsi, le pH doit être ajusté et contrôlé, les composés doivent rester sous une forme non-dissociée pour être extraits facilement (**Betancourt, 2008**).

III. Applications de l'extraction par micro-extraction en phase solide en espace de tête (Head space solide phase micro-extraction HS-SPME)

La SPME a été largement utilisée dans le domaine alimentaire que ce soit pour l'évaluation de la qualité nutritionnelle, la caractérisation d'additifs ou l'analyse des contaminants présents à l'état de trace, comme pour l'analyse des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans le lait et les produits laitiers (**Aguinaga *et al.*, 2007**), la viande fumée ou alors dans les fruits et légumes pour la recherche des pesticides (Chai et Guan).

La SPME a aussi montré sa performance dans les secteurs pharmaceutiques et biomédicaux. L'une des applications connues du grand public est l'analyse des amphétamines dans l'urine. Ces analytes ont été également détectés dans le sang (**Mastroianni *et al.*, 2012**), la salive (**Milhome *et al.*, 2011**) et les cheveux humains (**Sporkert et Pragst, 2000**). Quant au domaine environnemental, la SPME a aussi fait ses preuves notamment pour l'analyse des HAP dans les eaux usées ainsi que pour l'analyse des composés organiques volatiles dans les eaux (**Cervera *et al.*, 2011**) et pour examiner les résidus de pesticides organophosphorés (et organochlorés dans des échantillons de légumes (concombre) et de fruits (fraises) (**Chai et Guan, 2011**).

Conclusion

La micro-extraction sur phase solide permet de réaliser des extractions quantitatives, cette méthode offre donc une relative souplesse pour l'échantillonnage et la quantification de composés organiques. Le mode de sorption associé à la nature de la fibre influence toutefois le protocole d'échantillonnage.

On note également que l'humidité et la température ont ou peuvent avoir, selon la nature de la fibre, une influence significative sur la quantité de composés extraits. De ce fait, il faut donc apporter aux conditions d'échantillonnages une importance particulière.

Partie

Expérimentale

Matériels

et

Méthodes

Chapitre 1 : Présentation du matériels et des méthodes utilisés dans la première partie de l'étude

I. Matériels

I.1. Matériel végétal

Thapsia garganica a été récoltée entre le mois de Mars-Avril 2014 et 2015 à partir de 800m d'altitude environ des montagnes de Sidi-Aich, d'Akfadou et de Kharrata de la wilaya de Béjaïa et à Ain Boucif de la wilaya de Médéa (**Fig.17**) ; le nom local, les pièces de plantes usées, les méthodes de préparation et d'administration, ainsi que les utilisations médicinales ont été recueillies auprès des habitants locaux. Après séparation et nettoyage des racines et des feuilles, le séchage à l'air ambiant a été effectué au niveau de laboratoire de chimie de l'ENSA, les parties de la plante ont été finement broyées par la suite.

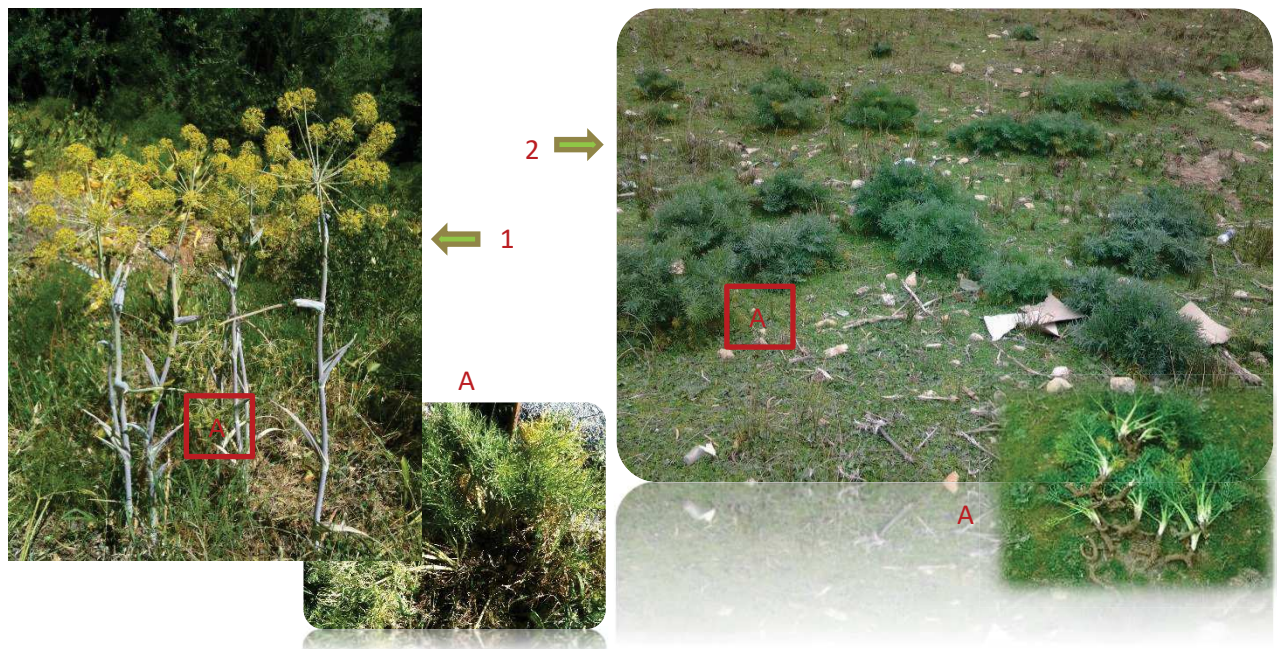


Figure 17 : (1) Photo de *T.garganica* prise lors du prélèvement dans la région de Sidi-Aich, Béjaïa ; (2) : Photo de *T.garganica* prise lors du prélèvement dans la région d'Aïn-Boussif, Médéa ; (A) : Agrandissement de la partie terrestre racines et feuilles

I.1.1. Coordonnées GPS des deux zones d'étude

➤ **Aïn Boucif** : est une ville algérienne, située dans le daïra d'Aïn Boucif et la wilaya de Médéa. La ville s'étend sur 314,4 km² et compte 26042 habitants depuis le dernier recensement de la population. La densité de population est de 82,8 hab/km² sur la ville. Entourée par Sidi Damed, El Ouinet et Ouled Maaref, Aïn Boucif est située à 23 km au sud-ouest de Chellalat El Adhaoura la plus grande ville à proximité. Située à 1129 mètres d'altitude (**Schéma 3**).

Les coordonnées géographiques d'Aïn Boucif en décimales sont : 35.8912° de latitude et 3.1585° de longitude.

Les coordonnées géographiques sexagésimales d'Aïn Boucif sont : latitude nord 35° 53' 28" et longitude est 3° 9' 31".



Schéma 3.1 : Localisation du site d'étude et de cueillette de la plante *T. graganica* (Médéa)

➤ **Kherrata, Akfadou et Sidi Aïch** : sont des villes algériennes, situées dans la wilaya de Béjaïa dont l'altitude varie entre un minimum de 498, 620 et 111 mètres et un maximum de 1896, 1100 et 1560 mètres respectivement, caractérisées par un climat méditerranéen avec été chaud (Classification de Köppen: Csa) :

- Les coordonnées géographiques sexagésimales de Sidi Aïch : latitude nord 36° 36' 46" nord, longitude 4° 41' 18" est. Superficie de 770 hectares, 7,70 km² (2,97 sq mi),
- Les coordonnées géographiques sexagésimales d'Akfadou : latitude 36° 17' 39" nord, longitude 4° 33' 16" est. Superficie de 42,01 km². Dont la population est de 7 358 hab. (20082) et de densité de 175 hab/km².
- Les coordonnées géographiques sexagésimales de Kherrata sont : latitude 36° 29' 34" nord et longitude 5° 16' 39" est. Superficie de 97,30 km², et compte 35 077 habitants depuis le dernier recensement de la population, d'une densité de 360,5 hab/km² sur la ville.



Schéma 3.2 : Localisation des sites d'étude et de cueillette de la plante *T. graganica* (Béjaïa)

I.1.2. Extraction, amplification et séquençage d'ADN

La notion de taxonomie et d'espèce de *Thapsia* n'est pas résolue (Weitzel *et al.*, 2014), de sorte que, pour confirmer l'identité des échantillons recueillis, l'ADN génomique total d'un échantillon par site (nombres d'accession à l'herbier: C10011584, C10011585) a été extrait à partir de 15 mg de fragments de feuilles séchées, en utilisant le Qiagen DNeasy Kit (Qiagen, Copenhague, Danemark) suivant le protocole du fabricant. La région de la séquence nucléotidique de l'espaceur transcrit (ITS) de l'ADN ribosomique nucléaire (nrITS) a été séquencée comme décrit précédemment par (Weitzel *et al.*, 2014), en utilisant les amorces ITS4 et ITS5. Les séquences ont été éditées et assemblées à l'aide du logiciel CLC Main Workbench7 et ensuite soumises à NCBI BLAST pour l'identification des espèces en fonction de la disponibilité dans GenBank des séquences STI pour la plupart des espèces de *Thapsia* de Weitzel *et al.*, (2014) et des séquences générées des Apiaceae apparentées à d'autres études par exemple (Banasiak *et al.*, 2013).

I.1.3. Irradiation

I.1.3.1. Appareillages utilisés

I.1.3.1.1. Irradiateur pilote du CRNA

Il a été installé en 1986 au niveau du CRNA. L'irradiateur gamma est composé de :

- Une cellule blindée qui constitue une protection biologique pour le personnel d'exploitation et l'environnement
- Une source de rayonnement gamma constituée de 3 crayons en acier inoxydable (contenant l'élément radioactif qui est le Cobalt₆₀ (⁶⁰Co)). Les 3 crayons source de cobalt ₆₀ sont contenues dans une « porte source », l'activité au moment de l'irradiation est 9400 ci.
- La source est stockée dans une piscine qui permet d'escamoter la source et de ne laisser échapper aucune fuite de rayonnement. (Schéma 4)

I.1.3.1.2. Sources :

La source de rayonnement gamma utilisée est le cobalt 60 (⁶⁰Co). Le cobalt 60 est un radionucléide artificiel produit dans des réacteurs nucléaires à partir du Cobalt 59, métal stable non réactif. Le Cobalt 60 radioactif émet un rayonnement β^- puis en cascade, 2 photons γ d'énergie 1,17 et 1,33 MeV. La période radioactive est de 5,27 ans (temps au bout duquel la quantité de rayonnement émise diminue de moitié).

L'irradiateur pilote du Centre de Recherche Nucléaire d'Alger (CRNA) est composé de trois sources cylindriques de ^{60}Co de type COP4 fabriquées par ORIS (France). Elles sont disposées verticalement dans un porte-source en acier inoxydable.

Les sources de dimension 384 mm de hauteur et de 26,6 mm de diamètre ainsi disposées forment une hauteur active de 1152 mm. Pour des raisons pratiques une cale de 85mm a été déposée sous la source du bas.

En position d'irradiation, la partie inférieure de cette source se trouve à 350 mm au-dessus de la platine.

L'activité initiale au 08.10.2002 date d'installation de la source, était de $13,32 \cdot 10^{14}$ Bq soit 35990 Ci. L'activité de la source est environ 5800 Ci pour la période de notre irradiation de la plante.

I.1.3.1.3. Système dosimétrique

Cette source est destinée principalement pour des travaux de recherche, et occasionnellement à des prestations de service. Le contrôle de la qualité de l'irradiation est effectué à l'aide de deux systèmes dosimétriques :

Le système dit de **Fricke** est utilisé comme dosimètre de référence, et le polyméthylmétaacrylate (**PMMA**) comme dosimètre de routine.

– DOSIMETRES CHIMIQUES LIQUIDES STANDARDS DE REFERENCE FRICKE (ISO/ASTM 51026)

- Solution chimique formée de sulfate d'ammonium ferreux (Sel de Mohr) avec du sel de chlorure de sodium dans une solution d'acide sulfurique.
- Oxydation des ions ferreux en ions ferriques déterminée par mesure spectrophotométrique à 304 nm qui est le pic d'absorption de l'ion ferrique
- Gamme de dose est de 20 à 400 Gy

– DOSIMETRE AU POLYMETHYLMETHACRYLATE (PMMA) PMMA BLANC

- Dosimètre de routine utilisé pour la stérilisation gamma
- Gamme de dose de 5 à 50 KGy
- L'échantillon est conditionné dans des sachets en aluminium et scellé jusqu'à utilisation
- Mesure de la densité optique à 314 nm par spectrophotométrie
- Mesure de l'épaisseur de l'échantillon avec un micromètre
- Dose déterminée à partir de la courbe de calibration

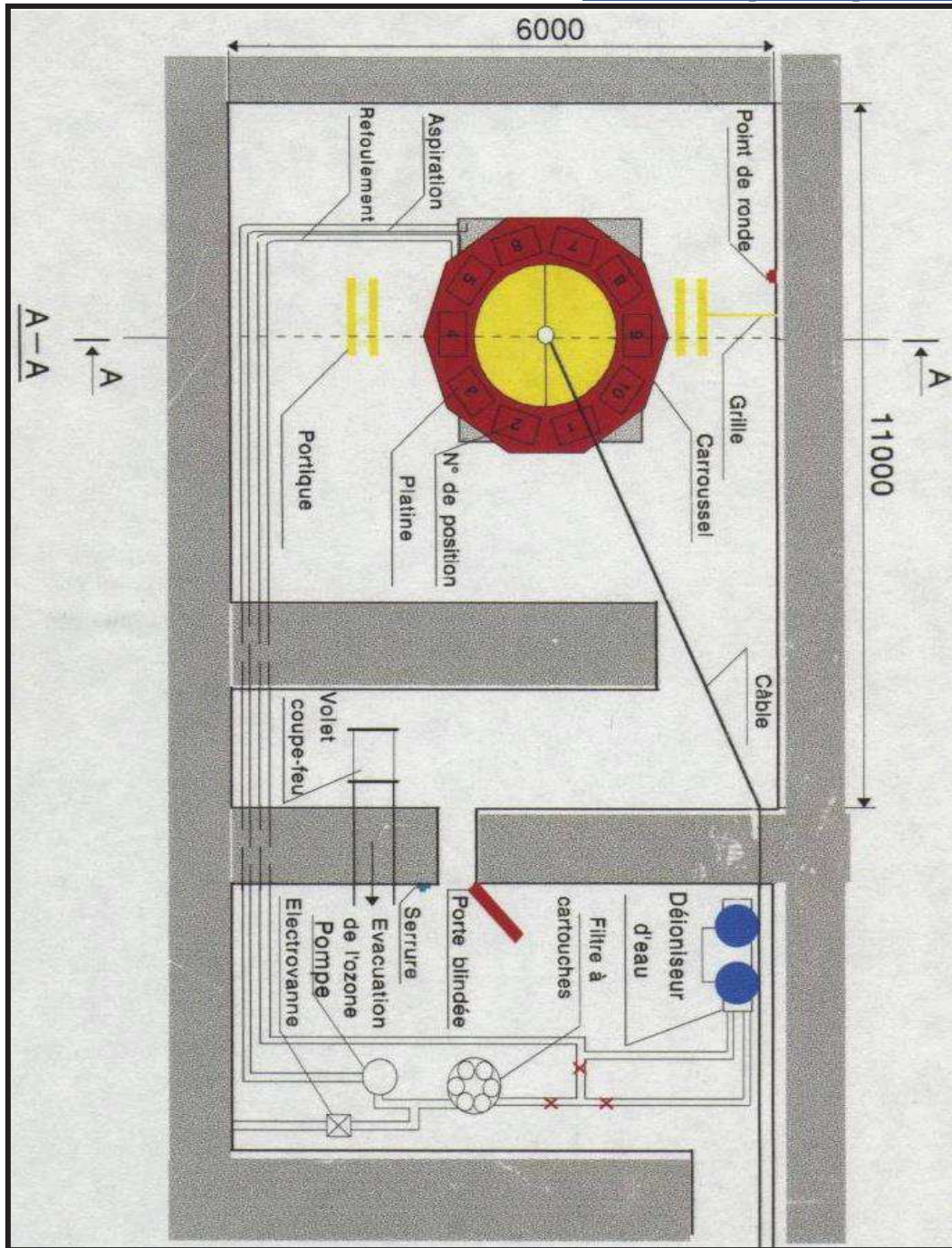


Schéma 4: Schéma de l'irradiateur pilote de CRNA

I.1.3.2. Traitement des échantillons

Des lots de 200g chacun de la quantité initiale de racines et de feuilles séchées ont été soumis à une irradiation sous rayons gamma (valeur en Kilo Gray) au niveau du Centre Nucléaire et de Recherche d'Alger (CNRA), à différentes doses $D_1:0.1$, $D_2:0.3$, $D_3:0.7$, $D_4:1$, $D_5:3$, $D_6:7$ et $D_7:10$ KGy à température ambiante avec une source de ^{60}Co . L'échantillon non-irradié ($D_0:0$ KGy) est utilisé comme témoin négatif. Les échantillons irradiés ont été conservés par la suite à l'obscurité et à température ambiante (environ 22°C) jusqu'au moment des analyses.

I.2. Matériel chimique

Acétone, méthanol et acétonitrile (HPLC grade), l'azote liquide, toluène, acétate d'éthyle vanilline, acide sulfurique (fournis de département de plant and environnemental sciences, Université de Copenhague, Danemark) ; DPPH• (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl hydrate, 95%), trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid, 97%), ABTS [2,2'-azino-bis (3-ethyl benzothiazoline-6-sulphonic acid)], NaCl, Na₂HPO₄, KCl and K₂S₂O₈ sont fournis par le laboratoire de technologie alimentaire et nutrition humaine (ENSA, Algérie).

– Solution standards

Pour l'identification et la quantification de la thapsigargine (Tg), thapsigargin (Tc) et de nortrilobolide (Nb), des références ont été utilisées pour les étalons extraits de fruits de *T.garganica* (don de Søren Brøgger Christensen, Copenhague, Danemark) (**Fig.18**). Des solutions standards ont été préparées en triple, diluées dans du MeOH à 80% (dilutions des standards : 5, 25, 50, 200, 400, 500, 600, 800, 1000 µg / ml).

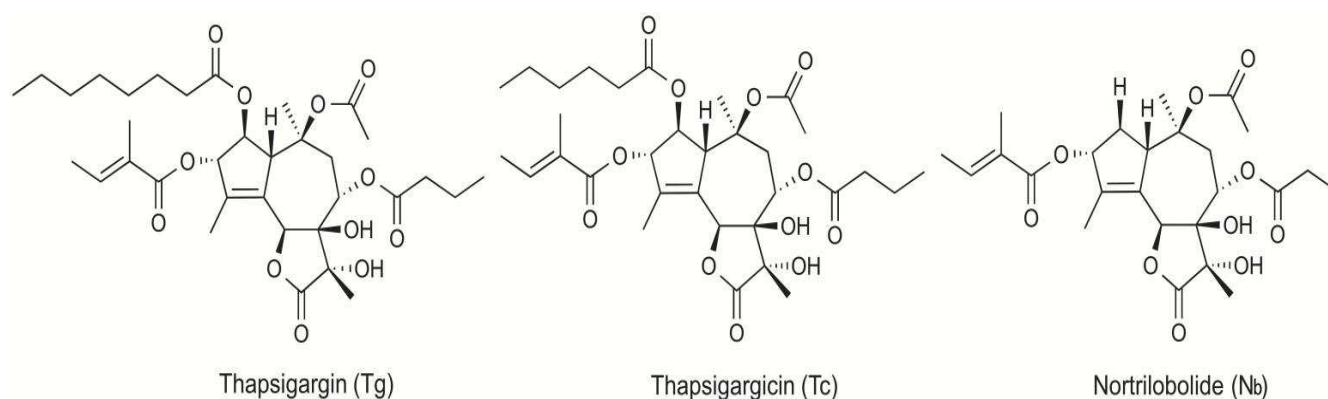


Figure 18 : Structure des standards recherchés et quantifiés dans notre étude

II. Méthodes

II.1. Techniques d'extraction

Les échantillons individuels de feuilles et de racines recueillies sur chaque site ont été traités comme des échantillons individuels à travers des extractions et des analyses HPLC jusqu'à l'analyse des données

II.1.1. Extraction classique des extraits méthanoliques de la partie racinaire et la partie aérienne (EC), en utilisant l'azote liquide N₂ à -196 ° C pour le broyage (ENL) (Fig.19)

On a ajouté 1,5 ml de solvant organique (80% de méthanol-20% d'eau : 80% d'acétone-20% d'eau) à 50 mg de matière végétale séchée homogénéisée puis soumis à un vortex à fond et agité pendant une nuit dans un thermomixer (Eppendorf® Thermomixer Compact) à 850 tr / min à 25 ° C. Les échantillons ont ensuite été centrifugés pendant 10 min à 10 000 tr / min. 1 ml de du surnageant a été ensuite été transféré dans un nouveau tube eppendorf et évaporé jusqu'à la sécheresse totale dans un concentrateur à vide (ScanSpeed MaxiVac Evaporator). On a ensuite ajouté 250 µl de méthanol à 80 ré-suspendre l'extrait pour une analyse HPLC. Les échantillons ont été stockés à 4 ° C.



Figure 19 : Broyage cryogénique avec de l'azote liquide à -196°C (ENL)

II.1.2. Extraction assistée par micro-ondes des extraits méthanoliques des racines et des feuilles irradiées et non irradiées (EAM)

40 g de matière végétale séchée et broyée (irradiée et non traitée) ont été extraites avec 100ml de méthanol (MeOH) dans un dispositif à micro-ondes (**Fig.20**) comme décrit précédemment (**Akloul et al., 2014**) (pendant 30, 40, 50 et 60 min pour un test préliminaire). Le mélange résultant a été filtré sous vide; puis soumis sous pression réduite dans un évaporateur rotatif à 40°C. Les échantillons ont ensuite été complètement lyophilisés et stockés à 4°C. Tous les échantillons ont été traités par extraction micro-onde pour une durée fixée à 30min. 1 mg de chaque extrait sec a été remis en suspension dans 1 ml de méthanol à 80% avant analyse HPLC.



Figure 20 : Dispositif d'extraction par micro-onde (EAM)

II.1.3. Extraction par macération classique des extraits méthanoliques de racines et feuilles irradiées et non irradiées (MC)

Des échantillons de 40 g de racines et de feuilles séchées et broyées (irradiées et non traitées) de *T.garganica* L. ont été submergés dans du méthanol (100 ml, 40°C, 10 h sous agitation magnétique). (**Fig.21**). Après filtration, les extraits méthanoliques ont été concentrés sous pression réduite au rotavapeur pour obtenir des extraits bruts, puis lyophilisés pour éliminer toute trace de solvant et stockés à 4°C. Avant l'analyse HPLC, 1 mg de chaque échantillon a été remis en suspension dans 1 ml de méthanol à 80%.



Figure 21 : Procédé d'extraction par macération classique (MC)

Tableau 3 : Parties de plantes sélectionnées et méthodes d'extraction des extraits méthanoliques (ou extraits volatils)

N°	Nom de la plante	Régions	Parties de plantes	Methode d'extraction de EM
1	<i>Thapsia garganica L</i>	Béjaia	Racines	MC
				EC
				EAM
2	<i>Thapsia garganica L</i>	Béjaia	Feuilles	MC
				EC
				EAM
3	<i>Thapsia garganica L</i>	Médea	Racines	MC
				EC
				EAM
4	<i>Thapsia garganica L</i>	Médea	Feuilles	MC
				EC
				EAM

EM : extraits méthanoliques, MC : macération classique, EC : extraction classique en utilisant l'azote liquide pour le broyage, EAM : extraction assistée par micro-onde

II.2. Technique analytique

II.2.1. Optimisation de l'analyse HPLC

Test préliminaire : des tests préliminaires ont été effectués afin d'optimiser une bonne analyse.

Les solvants testés :

N°1 : MeOH80% /Acétone 80%

N°2 : acétate d'éthyle

N°3 : MeOH 80% /Acétonitrile 80%

Préparation de matériel végétal :

➤ Pesé :

50mg de plante sèche (racines, feuilles) broyée + 1,5ml de Solvant N°1

20mg de plante sèche broyée+ 1ml de Solvant N°2

50mg de plante sèche broyée+ 1,5ml de Solvant N°3

➤ Agitation par vortex pendant quelque secondes

➤ Agitation thermique 850tr/min à 25°C pendant toute une nuit (Thermomixer Compact)

Préparation de l'extrait de plante :

➤ Prendre 1ml de la phase liquide et le mettre dans des tubes neufs

➤ Passage à l'évaporation au speed-vacuum à des conditions :

– 1000tr/min

– Température de 40°C

– 160 min ou plus, jusqu'à évaporation totale du solvant

➤ Filtration :

➤ Ajouter 250µL de MeOH 80% dans chaque tube et mélanger au vortex

➤ Filtrer à une porosité de 0,45µm

➤ Conserver les extraits filtrés au frais (-20°C)

Analyse chromatographique sur couche mince :

Phase stationnaire : Gel de silice

Phase mobile ou éluant :

1. Acétate d'éthyle+ MeOH

2. Toluène +Acétate d'éthyle+ MeOH

3. Toluène+ Acétate d'éthyle

Après migration des composés sur la plaque par capillarité, cette dernière est soumise sous une lampe UV à 254 nm et à 362 nm.

Résultat de l'observation :

Eluant	Observations	Le choix du solvant de migration
Acétate d'éthyle+MeOH	Une ligne de points de même distance marquée par la migration des composés des extraits	Non retenu
Toluène+MeOH	Une légère différence entre les distances des points révélant la migration	Non retenu
Toluène+Acétate d'éthyle	Une grande différence entre les fluorescences des points de composés	<u>Retenu</u>

Révélation :

Le révélateur –spray est : **la Vanilline + Acide sulfurique**

En plongeant la plaque- après passage sous UV- dans une solution de révélateur et après chauffage et séchage on remarque l'apparition de nombreuse taches colorées qui ont été faiblement visibles aux UV ou non existantes (Fig.22)

✓ Cela explique une forte intensité avec la vanilline

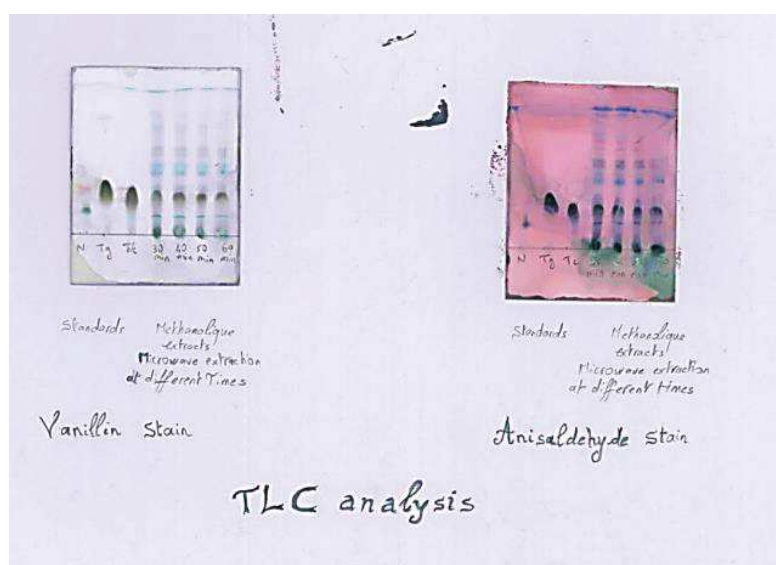


Figure 22 : Choix du bon révélateur-Spray afin d'optimiser l'analyse HPLC

Le choix du bon solvant d'extraction

Après l'analyse des différents extraits par CCM de gel de silice, il apparait que le solvant N°3 : MeOH 80% / Acétonitrile 80% est le meilleur à pouvoir extraire plus de composés, où on a remarqué plus de taches colorées surtout après la révélation-spray (Fig.23)

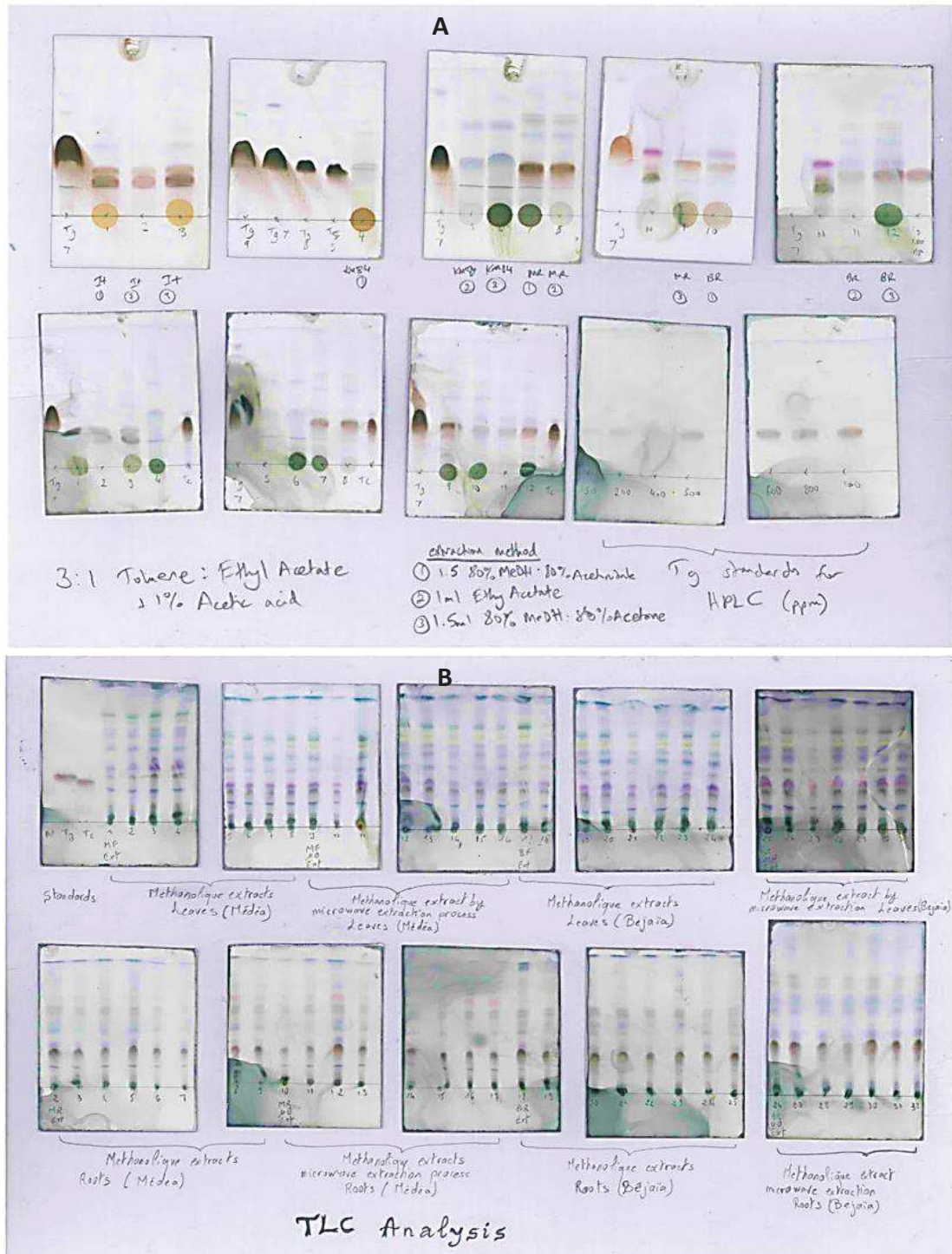


Figure 23 : A : Test de révélation de standards et de quelques échantillons racinaires et aériens pour un meilleur éluant de l'analyse. **B :** Test TLC pour tous les échantillons de l'analyse.

II.2.2 Analyse des échantillons de la plante *T.garganica* par HPLC

A. Les standards

- **Conditions de fonctionnement de HPLC** (vérification des standards)
 - Colonne : C4 Phenomenex Synergi 4U Fusion RP 80A ; taille – 108 mm x 4,60 mm 4 µm ; numéro de série - 375234-1 ; P no. - 00D-4424-E0
 - Appareil: Waters 2795 module de separations
 - Détecteur: Waters 996 Photodiode Array detector
 - Débit : 1ml/ min
 - Méthode de gradient (soit isocratique soit en dégradé celui-ci est dégradé) :
 - Eluant A: 95 parties d'eau mq, 5 parties d'acétonitrile, 0,1% d'acide formique
 - Eluant B: 95 parties d'acétonitrile, 5 parties d'eau milliq, 0,1% d'acide formique
 - 50% A à 100% B en 9min
 - De 12min à 13min à 100% A
 - De 15min à 16min à 50% B
- **Analyse RMN**
 - Dans les tubes RMN, dissoudre 25 mg de composé.
 - Gratter le composé du flacon avec le tube RMN.
 - Placer dans un flacon propre et ajouter 5 ml de chloroforme (solvant de verrouillage).
 - Dissoudre ce qui est autour du tube et avec une seringue insérer la solution dans le tube.
 - Placer un bouchon sur le tube RMN et nettoyer autour du tube avec de l'acétone et assurer de ne pas laisser d'empreintes de doigts ou composé autour de ce dernier.
 - Insérer le tube dans la centrifugeuse. Placez-le dans la jauge de profondeur et poussez-le vers le bas. Sans toucher au fileur.
 - Réglez le tube de sorte que l'échantillon soit sur la ligne droite (4) (**Fig.24**).
 - Insérer l'échantillon dans la RMN, et laisser procéder.
 - Les conditions choisies étaient le proton, le carbone 13 et 500 passages.

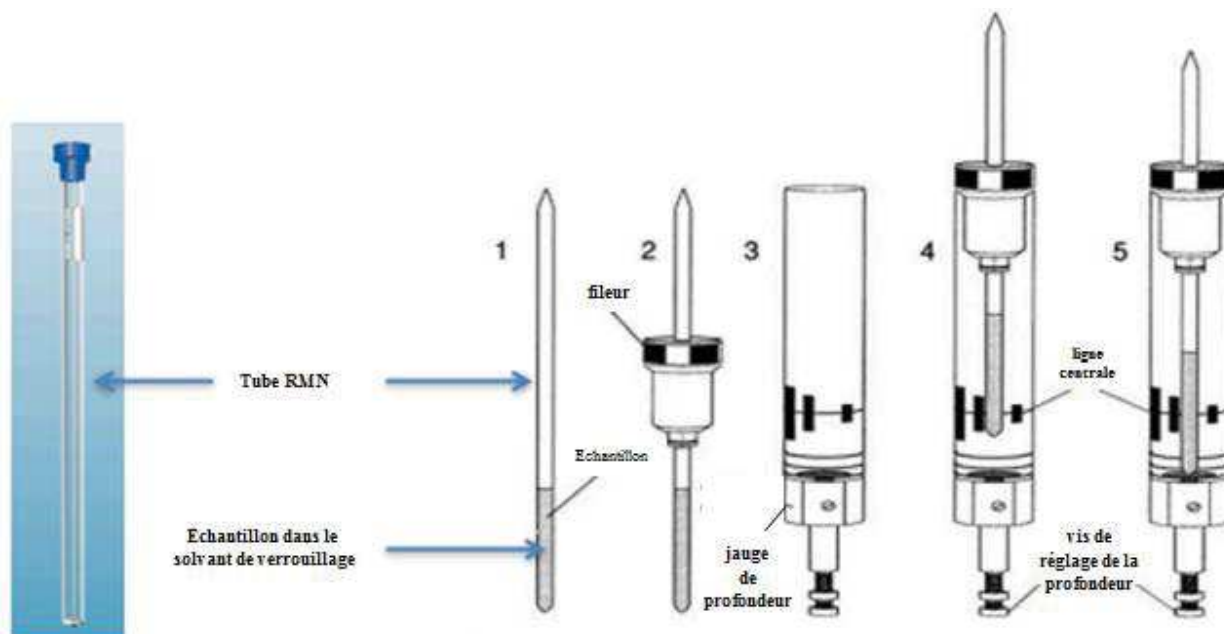


Figure 24 : Etapes de l'analyse RMN pour la détermination des standards

B. Les échantillons

Tous les échantillons d'extraits de plante irradiés et non irradiés ont été filtrés dans des filtres centrifuges (Ultrafree® MC GV, 0,22 μm de Durapore® PVDF) juste avant l'injection dans la HPLC. L'analyse par HPLC a été réalisée sur une prévision analytique HPLC-UV Shimadzu (colonne de four à 30°C, auto-échantillonneur 15°C) et réalisée sur une colonne Kinetix EVO C18 100A (5 μm , 50mm \times 3mm, Phenomenex). L'analyse HPLC est faite en triplicata pour chaque échantillon, tout en injectant les trois standards recherchés dans l'étude.

Conditions opératoires du dispositif HPLC

- Solvant (A) : Acétonitrile 50%.
- Solvant (B) : Eau milliQ.
- Débit : 0,5ml/min (fixé après des essais de stabilité et d'équilibrage de la pression).
- Temps : 30min.
- Le blanc : Eau 100% MeOH 100%, MeOH 80%,
- Le programme de gradient était le suivant : 50% A (0-1min, gradient linéaire), 100% A (6-9min, g. linéaire), 5% A (14-16min, g. linéaire), 50% A (17-23 min, g. linéaire).
- Standards utilisés : Trois thapsigargins pures (Tg), (Tc) et (Nb), à des concentrations allant de 50-1000 ppm.
- Volume d'injection des standards : 10, 15, 20 μl à raison d'optimisation du programme, puis fixé à 10 μl en trois exemplaires pour chaque échantillon.
- Les composés éluant ont été détectés avec des UV à 230 nm.

Analyse des extraits méthanoliques préparés

1. Extraction classique : 1 ml de la phase liquide a été transféré dans un nouveau tube eppendorf évaporé jusqu'à séchage total et remis en suspension, les échantillons stockés à 4°C sont filtrés (0,2245 µm) juste avant l'injection à HPLC.
2. Micro-ondes : 1mg de chaque extrait sec a été remis en suspension dans 1 ml de méthanol pur, filtré (filtres de nylon UptiDisc 0,45 µm) juste avant l'injection à HPCL.
3. Macération classique : une suspension de 1ml est ajoutée à 1 ml de méthanol, le mélange est filtré (0,45 µm) avant son analyse par HPLC.

Les mêmes conditions opératoires du dispositif HPLC utilisées auparavant ont été retenues pour analyser la composition chimique de tous les extraits méthanoliques.

Calcul

Les graphiques d'étalonnage ont été générés en traçant la surface du pic par rapport à la concentration des substances standards. Pour obtenir une courbe standard pour la quantification, les graphiques d'étalonnage étaient linéaires dans la plage de concentration de 50 à 1000 ppm et sur la base de 3 répétitions. Les courbes d'étalonnage pour chaque standard avaient un coefficient de corrélation de 0,999. Tous les solvants étaient de qualité CHROMASOLV® de Sigma-Aldrich.

II.3. Analyse de l'activité antioxydante

A. Tests effectués

1. Effet scavenger du radical DPPH

Dans ce test, les antioxydants réduisent le radical 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune en cédant un proton, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu.

1.1. Préparation d'une solution mère d'échantillon

A partir de la solution mère on prépare par dilution des solutions de concentrations plus faibles qui seront destinées à fournir des concentrations inférieures à celle de 1000 mg/L (par exemple 800, 600, 400, 200, 100 mg/L etc.)

1.2. Préparation de la solution alcoolique de DPPH

On prépare 100 ml d'une solution de DPPH dans le même type de solvant que celui utilisé pour préparer l'échantillon et ses dilutions (Ethanol ou méthanol).

1.3. Protocole expérimental

- Régler le spectrophotomètre à la longueur d'onde 517 nm
- Régler le zéro avec du solvant pur qui a été utilisé pour la préparation des échantillons et du DPPH (Ethanol ou méthanol).
- Pour un échantillon donné et une concentration donnée on procède comme suit : on prélève 975 μ L de la solution de DPPH et on mesure son absorbance A_0 . Puis, on lui ajoute 25 μ L de la solution d'échantillon. On laisse le mélange incuber (pendant 30 minutes) à l'abri de la lumière et on mesure son absorbance A_t (t=30 minutes). On répète cette expérience au moins 3 fois pour la même concentration et le même échantillon ou le standard.

1.4. Calcul des pourcentages d'inhibitions

L'activité antioxydante ou le pouvoir antioxydant est donné (pour les échantillons non colorés) par la formule :

$$A\% = 100 (A_0 - A_t) / A_0 = (1 - A_t / A_0) 100$$

Où A_0 est l'absorbance du témoin (ne contenant aucun extrait échantillon) à t=0min et A_t est l'absorbance de l'échantillon après 30min. La solution stock DPPH \cdot a été fraîchement préparée avant chaque réaction afin de réduire la perte de l'activité du radical libre durant l'expérimentation.

Les résultats sont toujours comparés par rapport à un ou plusieurs témoins positifs. Ces témoins positifs sont souvent des antioxydants de synthèse qui sont actuellement utilisés dans l'industrie agroalimentaire. Tel que le **BHT** (Buthylhydroxytoluene), le **BHA** (Buthylhydroxyanisole), le **TBHQ** (Terbutylhydroquinone), le tocopherol etc.

Quel que soit le témoin positif utilisé, sa préparation et son expérimentation sont identiques à celles des autres échantillons.

1.5. Calcul des IC50

L'IC50 est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH, appelée IC50 ou SC50 ou EC50. Les IC50 sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées et les standards.

2. Test ABTS ou 2,2-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) radical scavenging activity (ABTS)

2.1. Préparation de la solution du radical ABTS

La méthode d'ABTS est basée sur la réduction du radical cation d'ABTS (bleu) obtenu par oxydation avec du persulfate de potassium (Scalzo *et al.*, 2005) pendant 12-16 h à 4° C à l'abri de la lumière. Le jour de l'analyse la solution d'ABTS^{•+} sera diluée avec de l'éthanol jusqu'à une absorbance de 1.00± 0.02 à 734nm. Après l'addition d'échantillon à la solution d'ABTS^{•+}, la diminution de l'absorbance sera mesurée après 7min à 734 nm dans le spectrophotomètre. L'ABTS^{•+} est utilisé comme témoin négatif et le TROLOX comme témoin positif et l'Ethanol pour le réglage du zéro.

2.2. Mode opératoire

Dilution de la solution ABTS avec de l'éthanol jusqu'à une absorbance de 1±0,02 à 734 nm. L'éthanol est utilisé pour régler le zéro.

- Ajout de 25µl d'échantillon (extrait).
- Ajout de 1ml de la solution ABTS^{•+}.
- Laisser reposer pendant 7minutes.
- Mesure de l'absorbance à 734nm.

Les expériences sont réalisées en 3 répétitions pour chaque concentration de chaque échantillon.

2.3. Calcul du pourcentage d'inhibition

L'activité l'inhibition du radical des échantillons testés, est exprimé comme étant le pourcentage d'inhibition de ABTS^{•+} (I%), est calculé en utilisant la formule suivante :

$$I\% = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 100$$

A₀ et A_s sont les valeurs de l'absorbance du témoin négatif (sans extrait) et de l'échantillon de l'extrait testé, respectivement. Le I% après 7min est déterminé selon la variation de concentrations des échantillons.

II.4. Analyse de la volatile des racines et feuilles de *T.garganica* par HS-SPME-CG-MS

L'étude qualitative et quantitative des principaux thapsigargins que contient *Thapsia garganica* L. par HPLC a poussé à une analyse de la volatile du profil chimique des échantillons irradiés par rayons gamma provenant des deux régions Béjaïa et Médéa, afin d'évaluer l'effet d'irradiation sur l'aspect chimique des analytes extraits par la méthode HS-SPME après avoir fixé un certain nombre de paramètres d'analyse.

1. Broyage cryogénique (cryogrinding)

Le broyeur à rotor (Model Pulverisette 14, Fritsch, Allemagne) a été utilisé pour le broyage ambiant et cryogénique. Dans ce dispositif, la réduction de la taille de la particule s'effectue par les impacts des côtes rotatives et l'attrition de la particule sur le tamis et les surfaces de papeterie du moulin. La vitesse périphérique des rotors était de 70 (15000 tr / min) m s⁻¹.

2. Produits chimiques

Le mélange d'alcane (C5-C30) et les standards ont été fournis auprès de Sigma-Aldrich. Tous les autres produits chimiques étaient de la pureté la plus élevée disponible chez Merck ou Fluka.

3. Méthodes d'analyse utilisées

3.1. Broyage ambiant et cryogénique

Les feuilles et les racines de *T.garganica* L. ont été broyées à 250µm=dp1 (moyennement divisées) et 85µm=dp2 (finement divisé) de taille moyenne. Le broyage cryogénique a été effectué en ajoutant de l'azote liquide à -196°C aux plantes végétales dans une chambre froide à 0°C.

3.2. Analyse par micro-extraction en phase solide (HS-SPME)

Une masse d'échantillon broyé cryogénique sec a été transférée dans un flacon en septum en verre de 100 ml. Des fibres SPME revêtues de 100 µm de polydiméthylsiloxane (PDMS) ou 85 µm de polydiméthylsiloxane / divinylbenzène (PDMS / DVB) ont été rapidement insérées dans l'espace de tête du flacon. La fibre SPME disponible sur le marché et le support SPME manuel (SAAB-57330U) proviennent de Supelco (Bellefonte, PA, États-Unis). L'extraction a été maintenue dans un bain d'eau à 45°C pendant 10 min. Les deux fibres PDMS ainsi que PDMS / DVB ont été préconditionnées pendant 5 min dans l'injecteur du GC et du GC-MS à 280°C avant chaque extraction. La désorption thermique des métabolites a été effectuée à 280°C pendant 5 min. Chaque extraction de volatile a été effectuée trois fois.

3.3. Analyse GC

L'analyse de GC a été effectuée sur un modèle standard de la série 6890 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) en utilisant les conditions suivantes: colonne de silice-capillaire fusionnée avec une phase stationnaire non polaire HP5-MS (60 m, 0,25 mm id, Film de 0,25 μm , biphényle à 5%, diméthylpolysiloxane à 95%), détecteur utilisé FID, gaz porteur l'hélium (0,03 MPa, débit 0,5 mL min⁻¹), la température de l'injecteur et du détecteur sont respectivement réglés à 280 et 300°C. Le mode d'injection splitless a été utilisé; La température du four a été programmée à 60°C pendant 10 min, puis a progressé de 60 à 250°C à 4°C min⁻¹ et a été maintenue à 250°C pendant 8 min.

3.4. Analyse GC-MS

Les données GC / MS (70eV) ont été mesurées sur le même chromatographe en phase gazeux couplé à MSD 5973. Température source MS à 230°C ; MS quadrapole température à 150°C ; Température de l'interface à 290°C ; Balayage de masse, 30-550 amu. La colonne capillaire HP5-MS à silice fondue (60 m×0,25 mm×0,25 μm d'épaisseur de film) a été directement couplée au spectromètre de masse. Le gaz porteur était de l'hélium, avec un débit de 1,2 ml/min. La température du four a été programmée (60°C pendant 8 min, puis 60-250 °C à 4°C / min) et ensuite maintenue isotherme pendant 10 min. Port de l'injecteur : 250°C, détecteur : 280°C. Le mode splitless a été utilisé. Temps de balayage 1,5 s, temps sans partage : 0,75 min. Le logiciel Chemstation adopté pour traiter les spectres de masse et les chromatogrammes.

La plupart des constituants ont été identifiés par comparaison de leur indices de rétention de GC (RI) sur colonne de HP5-MS, déterminée par rapport à une série homologue de n-alcane C5-C30 et à ceux des normes authentiques disponibles dans le laboratoire d'auteurs et par comparaison de leurs modèles de fragmentation spectrale de masse avec ceux stockés dans la banque de données (bibliothèque Wiley / NBS) et la littérature (**Adams,2007**). La quantification a été effectuée avec le dodécane comme étalon interne. Les compositions des différents constituants sont données en valeurs moyennes réalisées trois fois.

Chapitre 2 : Présentation du matériels et des méthodes utilisés dans la deuxième partie de l'étude

Analyse SPME-CG-MS des fruits de *T.garganica*

I. Matériel

1. Matériel végétal

Vu l'importance du fruit, de nombreux paramètres de qualité, tels que les arômes, les arômes et les résidus de pesticides, définissent son opportunité. L'arôme du fruit est déterminé par un mélange complexe d'un grand nombre de CV, y compris les alcools, les aldéhydes, les esters carboxyliques et les cétones, est un attribut important de la qualité d'un fruit. Par conséquent, les études des profils volatils des fruits jouent un rôle important dans l'agriculture, la production de liqueur, la production de bonbons et l'industrie des huiles essentielles. Outre les inconvénients des méthodes conventionnelles de pré-traitement mentionnées ci-dessus, de nombreux composés volatils aromatiques instables se décomposent thermiquement ou se dégradent lors de l'extraction ou de la distillation thermique. Pour ces raisons, la SPME couplée à la chromatographie en phase gazeuse (GC) qui est devenue un outil exceptionnel pour la mesure des composés aromatiques et des résidus de pesticides dans les fruits. La technique SPME-CG-MS a été utilisée pour identifier et surveiller les COV émis par la plante *T.garganica*.

Les fruits de *Thapsia garganica* L. provient des montagnes de Tirourda (centre nord d'Algérie) de Tizi Ouzou. L'identification des espèces étudiées a été confirmée par le département botanique de l'ENSA et une dizaine de spécimens ont été déposés dans une collection botanique de l'ENSA. Les échantillons ont été stockés directement à 4°C jusqu'au déroulement de l'analyse.

2. Matériel de broyage et produits chimiques

Le même modèle de broyeur à rotor utilisé précédemment pour l'analyse des feuilles et racines a été utilisé pour le broyage ambiant et cryogénique cette fois ci des graines de *Thapsia garganica*.

Les conditions opératoires de la masse des échantillons (0.05, 0.02 et 0.1g), de diamètre des particules ($dp_1=250\mu\text{m}$ et $dp_2=85\mu\text{m}$) ainsi que le choix des fibres d'analyse (DVB et PDMS/DVB) ont été fixées.

II. Méthodes

1. Méthodes analytiques

Les mêmes méthodes utilisées pour l'analyse SPME des feuilles et racines de *Thapsia* citées précédemment pour broyage cryogénique, pour l'analyse par micro-extraction en phase solide (HS-SPME) et pour analyse GC ainsi que pour l'analyse GC-MS, ont été effectuées pour analyser les volatiles des graines de *Thapsia garganica* provenant des monts de Djurdjura.

2. Analyses statistiques

Analyse de la composante principale (ACP) et méthode d'analyse classification ascendante hiérarchique (CAH) : les données ont été analysées à l'aide de l'analyse de variance (ANOVA) et la signification des différences entre les moyennes a été déterminée à $p < 0,05$ en utilisant les tests à distance multiple de Duncan. Les résultats ont été exprimés en moyen \pm écart type. Pour évaluer si les paramètres de mesurage de variation influent sur les composants des huiles essentielles identifiées et leurs relations de quantification, 20 composés majeurs détectés dans les échantillons de fruits à une concentration moyenne supérieure à 2% de l'extrait volatile totale ont été sélectionnés et utilisés à cette fin. Ces composants et toutes les valeurs des extraits ont été soumis à une analyse de la composante principale (ACP) et à une analyse classification ascendante hiérarchique (CAH) à l'aide du logiciel SPSS 12.0 (SPSS Inc.Chicago, IL, États-Unis).

Résultats

et

Discussions

Chapitre 1 : Illustration des différents résultats des analyses testées dans la première partie de l'étude

Analyse chromatographique des racines et feuilles de *T.garganica* et de leurs volatiles sous l'effet des rayons gamma

I. Identification de la plante

Après identification botanique des espèces collectées au niveau du département Botanique de L'ENSA, l'analyse BLAST a confirmé le matériel des deux sites pour être *Thapsia garganica* (99% de correspondance) (Fig.25). Les nouvelles séquences générées sont déposées dans GenBank, avec les numéros d'accès suivants :

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Thapsia garganica voucher C:Living Collection DNA Ibiza internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal tra	1286	1286	98%	0.0	99%	KF160687.1
Thapsia garganica voucher C:Sandberg s/n internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer	1282	1282	97%	0.0	99%	KF160689.1
Thapsia garganica voucher C:Smitt 92-1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer;	1266	1266	96%	0.0	99%	KF160690.1
Thapsia garganica 5.8S rRNA gene and internal transcribed spacers 1 and 2 (ITS1, ITS2)	1230	1230	95%	0.0	99%	AJ007930.1
Thapsia gymnesica voucher C:Smitt 94-01 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer	1179	1179	98%	0.0	97%	KF160693.1
Thapsia garganica voucher Davis 53034 2-VI-1971 (E) internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1098	1098	83%	0.0	100%	FJ415143.1
Thapsia garganica voucher Edmondson & McClintock E 2579 10-V-1978 (E) internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, c	1092	1092	83%	0.0	99%	FJ415145.1
Thapsia transtagana voucher C:Smitt 81-6 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer	1074	1074	98%	0.0	94%	KF160717.1
Thapsia transtagana voucher C:Smitt 88-07 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer	1070	1070	98%	0.0	94%	KF160716.1
Thapsia transtagana voucher C:Smitt 81-16 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer	1070	1070	97%	0.0	94%	KF160714.1
Thapsia transtagana voucher C:Smitt 81-20 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer	1059	1059	97%	0.0	94%	KF160718.1
Thapsia transtagana voucher C:Smitt 87-15 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer	1057	1057	98%	0.0	94%	KF160719.1
Thapsia smittii voucher C:Weitzel 2011-5 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer	1013	1013	98%	0.0	93%	KF160711.1
Thapsia smittii voucher C:Smitt 87-08 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, p	1007	1007	98%	0.0	93%	KF160709.1

Figure 25 : Résultats du blast des séquences d'ADN testées, confirmant l'espèce de la plante étudiée, la *Thapsia garganica* L.

II. Résultats de l'analyse HPLC

II.1. Analyse chromatographique des standards étudiés

Pour purifier la thapsigargine et l'extraire en utilisant une HPLC, il est indispensable d'utiliser la HPLC préparative, puis pour de grandes quantités de matériau, cela prend beaucoup plus de temps qu'une colonne car la HPLC n'en donne que de petites quantités. Par conséquent, il est plus facile et plus efficace d'utiliser une colonne.

Après optimisation des conditions opératoires de l'analyse HPLC, les chromatogrammes obtenus illustrent les différents pics correspondant à chaque standard à différents temps de rétention (minutes) comme suit dans les figures 26 à 28 :

Résultat HPLC- Nb

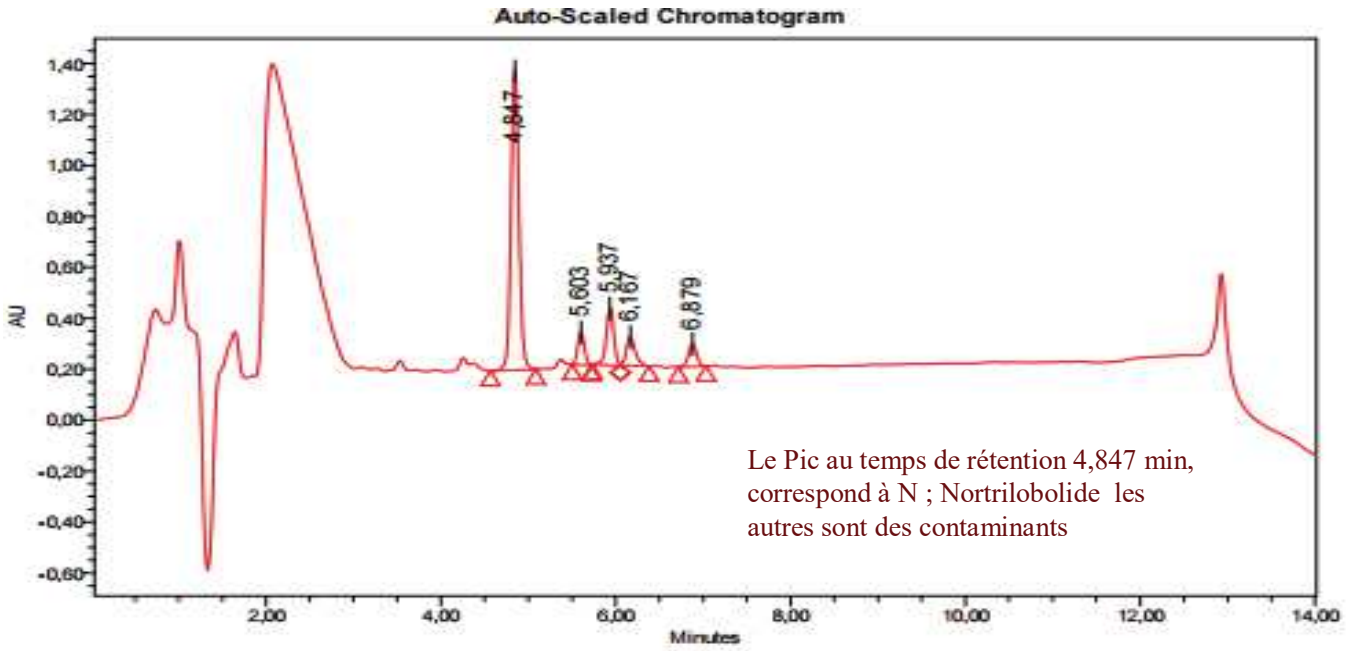


Figure 26 : Chromatogramme présentant le pic correspondant à la nortrilobolide

Tableau 4 : Temps de rétention du nortrilobolide

	Canal traité	Temps de Retention (min)	Aire	% Aire	Taille
1	PDA 220,0nm (PDA 210.0 à 400.0nm à 1.2nm)	4,847	7394760	68,36	1180431
2	PDA 220,0nm (PDA 210.0 à 400.0nm à 1.2nm)	5,603	692795	6,40	127425
3	PDA 220,0nm (PDA 210.0 à 400.0nm à 1.2nm)	5,937	1362297	12,59	222229
4	PDA 220,0nm (PDA 210.0 à 400.0nm à 1.2nm)	6,167	791295	7,31	111931
5	PDA 220,0nm (PDA 210.0 à 400.0nm à 1.2nm)	6,879	576598	5,33	89653

Résultat HPLC- Tc

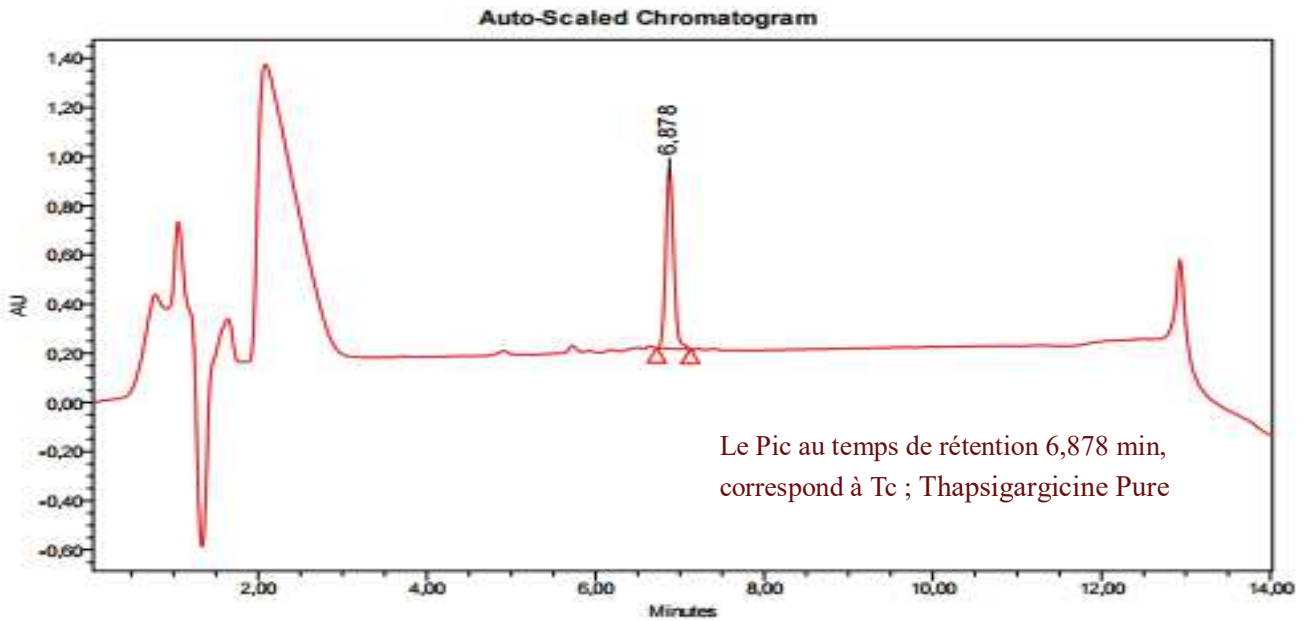


Figure 27 : Chromatogramme présentant le pic correspondant à la thapsigargin

Tableau5 : Temps de rétention de la thapsigargin

	Canal traité	Temps de Retention (min)	Aire	% Aire	Taille
1	PDA 220,0nm (PDA 210.0 à 400.0nm à 1.2nm)	6,878	4710148	100,00	729730

Résultat HPLC- Tg

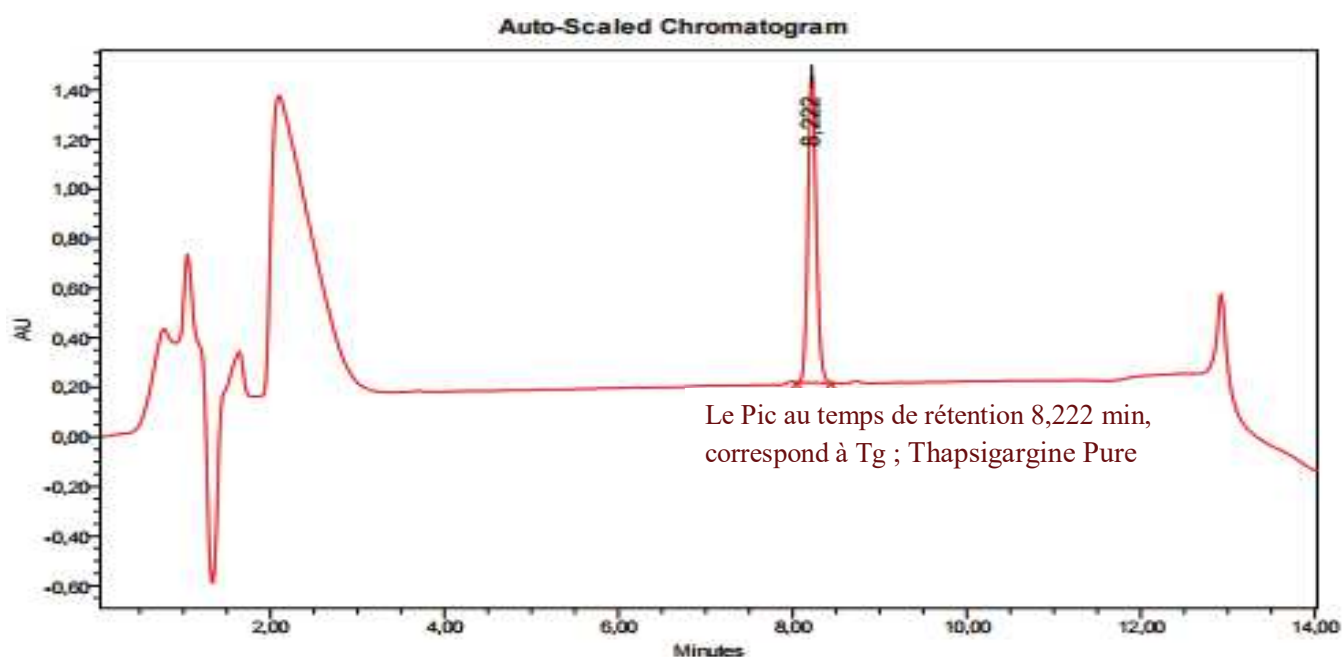


Figure 28 : Chromatogramme présentant le pic correspondant à la thapsigargine

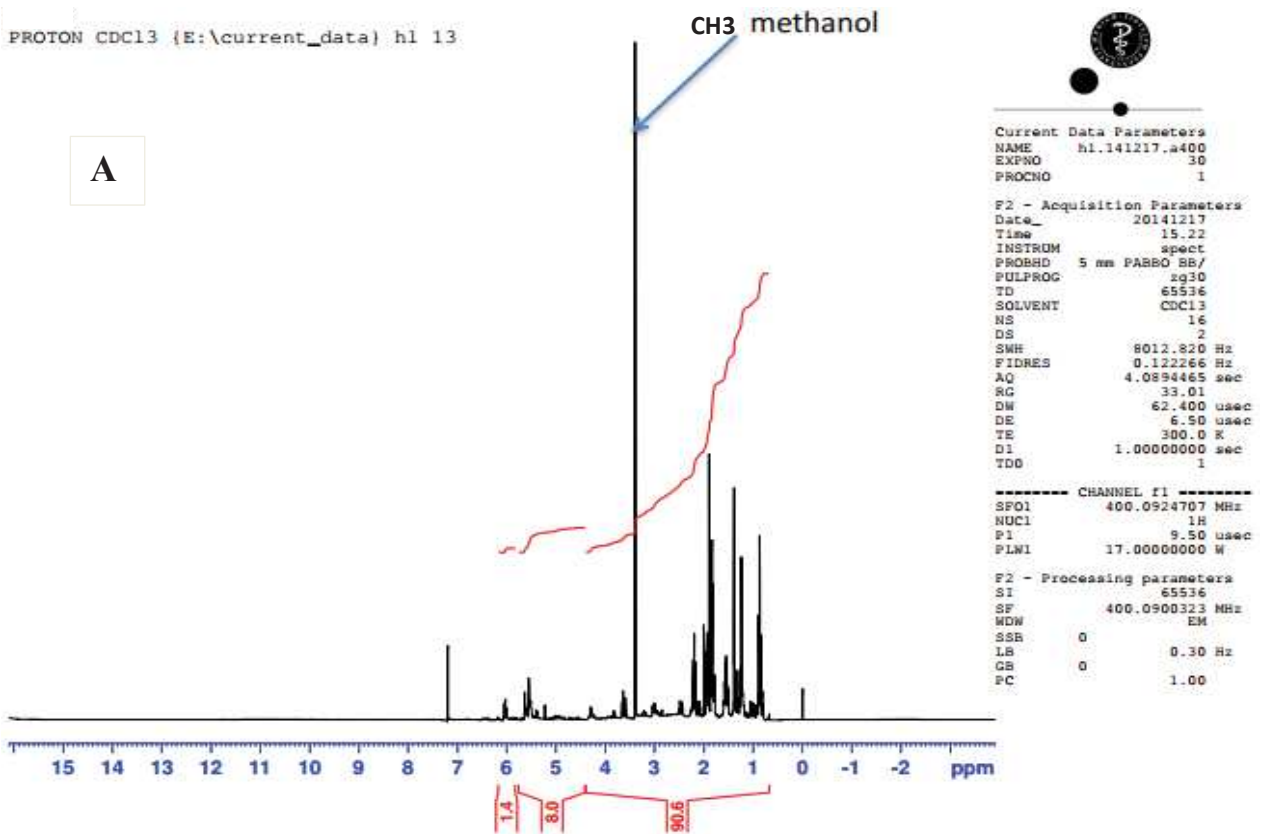
Tableau 6 : Temps de rétention de la thapsigargine

	Canal traité	Temps de rétention (min)	Aire	% Aire	Taille
1	PDA 220,0nm (PDA 210.0 à 400.0nm à 1.2nm)	8,222	8309380	100,00	1244843

Pour l'interprétation des spectres RMN, on se base sur la RMN du proton et la RMN du carbone 13.

Les spectres RMN sont d'une complexité qui dépend de la molécule et du noyau étudié. Les résultats pour chacun des standards sont présentés par les spectres dans les figures 29-31 suivantes :

Résultat RMN-Nb Proton



Résultat RMN-Nb Carbone

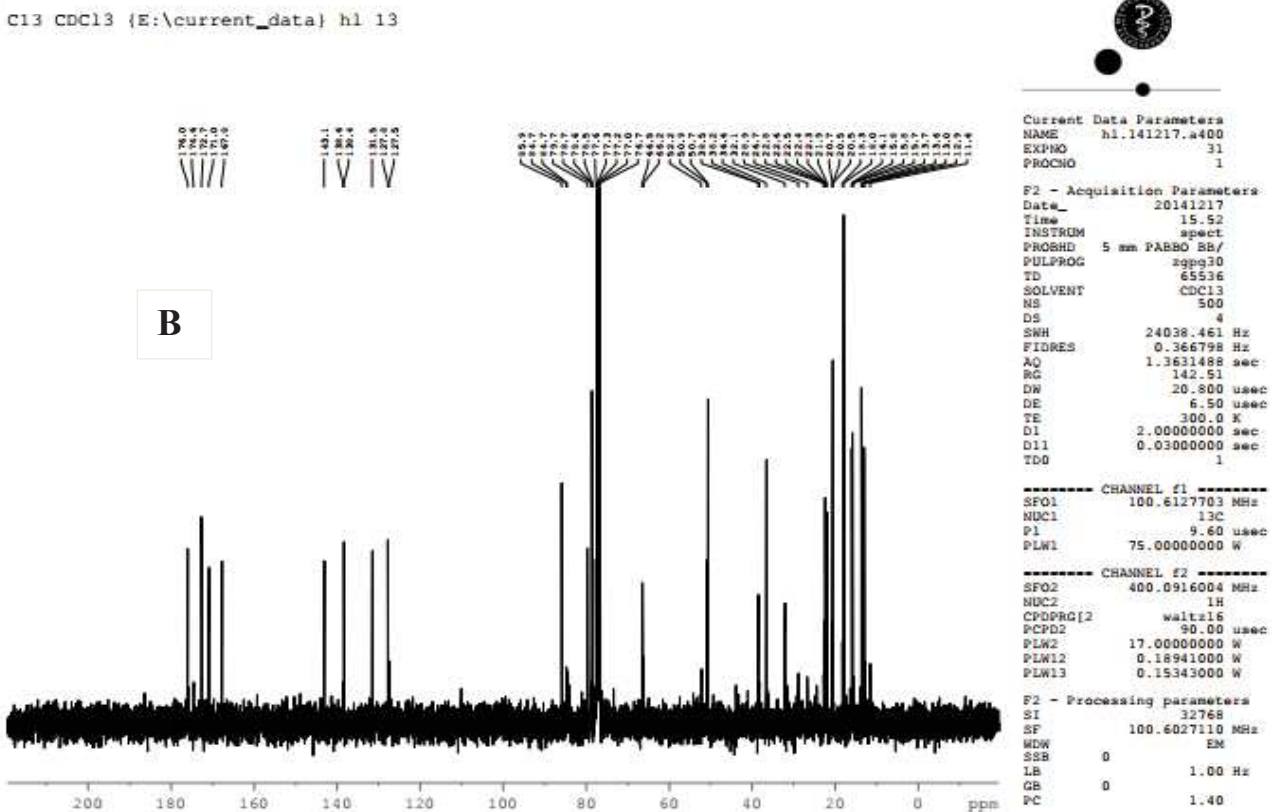
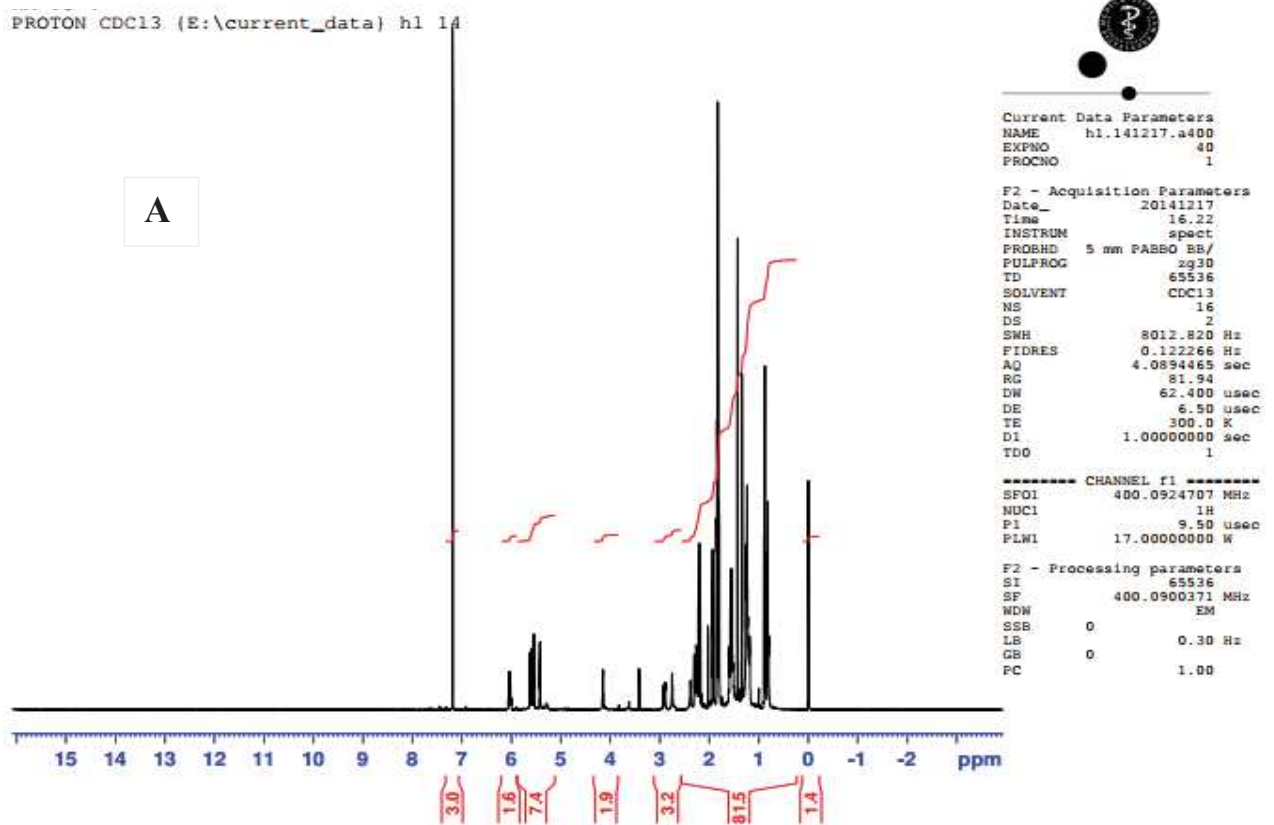


Figure 29 : Spectre RMN présentant le pic correspondant à nortrilobolide sur la base de A : la RMN du proton et B : la RMN au carbone 13.

Résultat RMN –Tc Proton



Résultat RMN –Tc Carbone

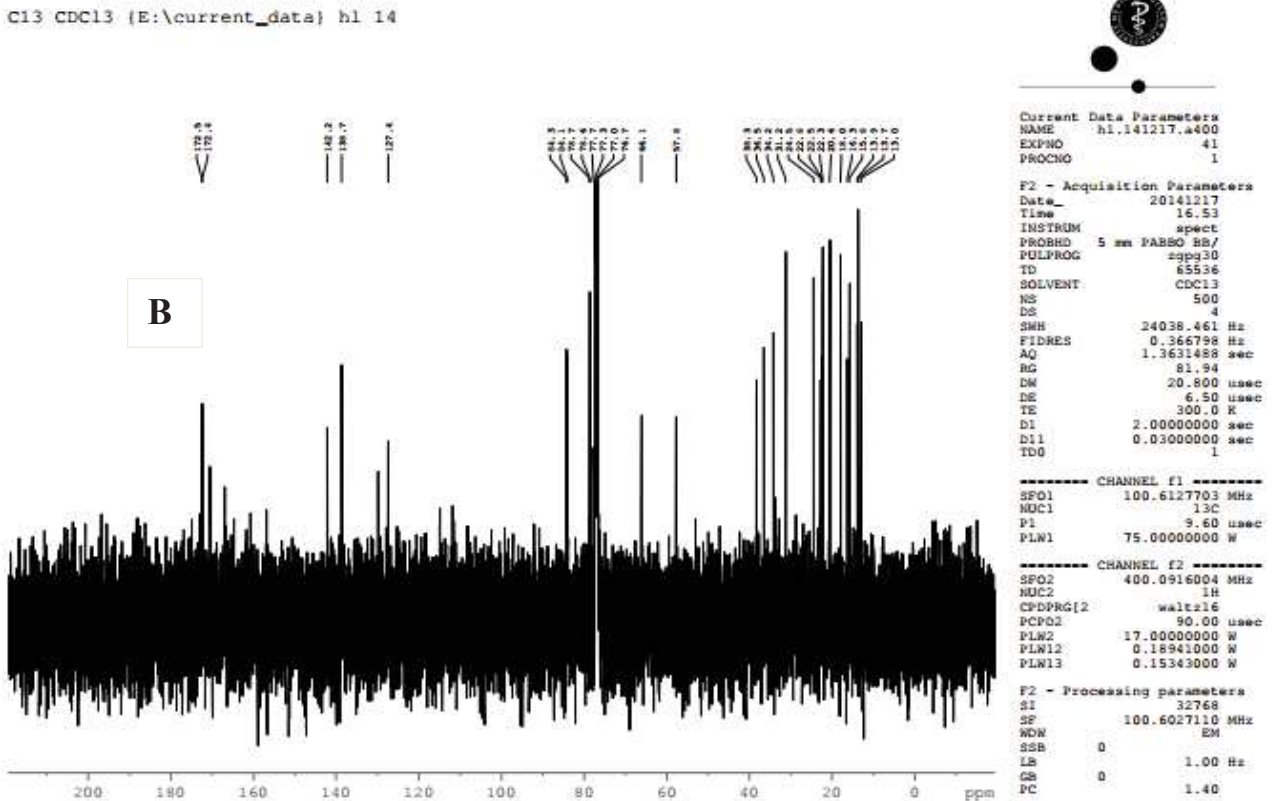
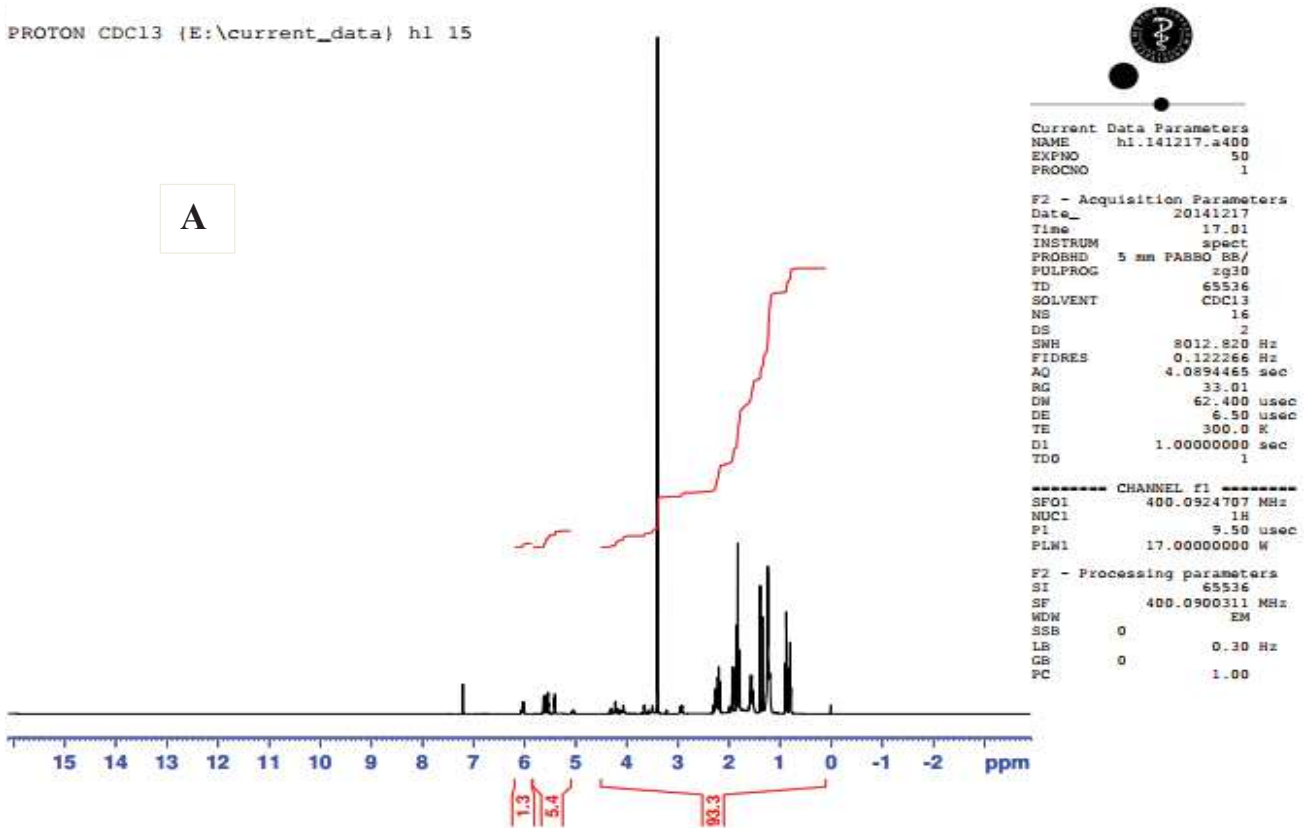


Figure 30 : Spectre RMN présentant le pic correspondant à la thapsigargin sur la base de A : la RMN du proton et B : la RMN au carbone 13.

Résultat RMN -Tg Proton

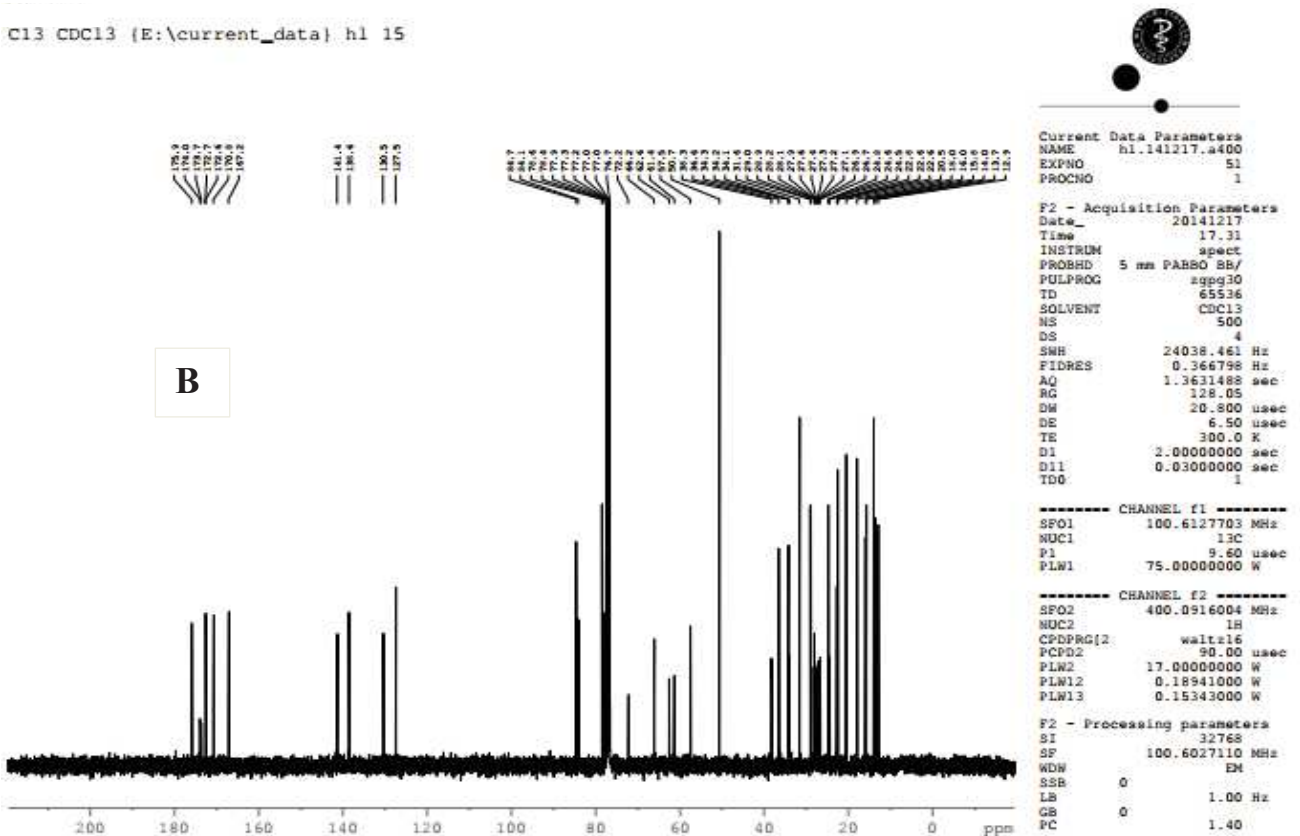
PROTON CDC13 {E:\current_data} h1 15



A

Résultat RMN -Tg Carbone

C13 CDC13 {E:\current_data} h1 15



B

Figure 31 : Spectre RMN présentant le pic correspondant à la thapsigargine sur la base de A : la RMN du proton et B : la RMN au carbone 13.

II.2. Analyse du profil chimique des racines et feuilles de *T. garganica* par HPLC

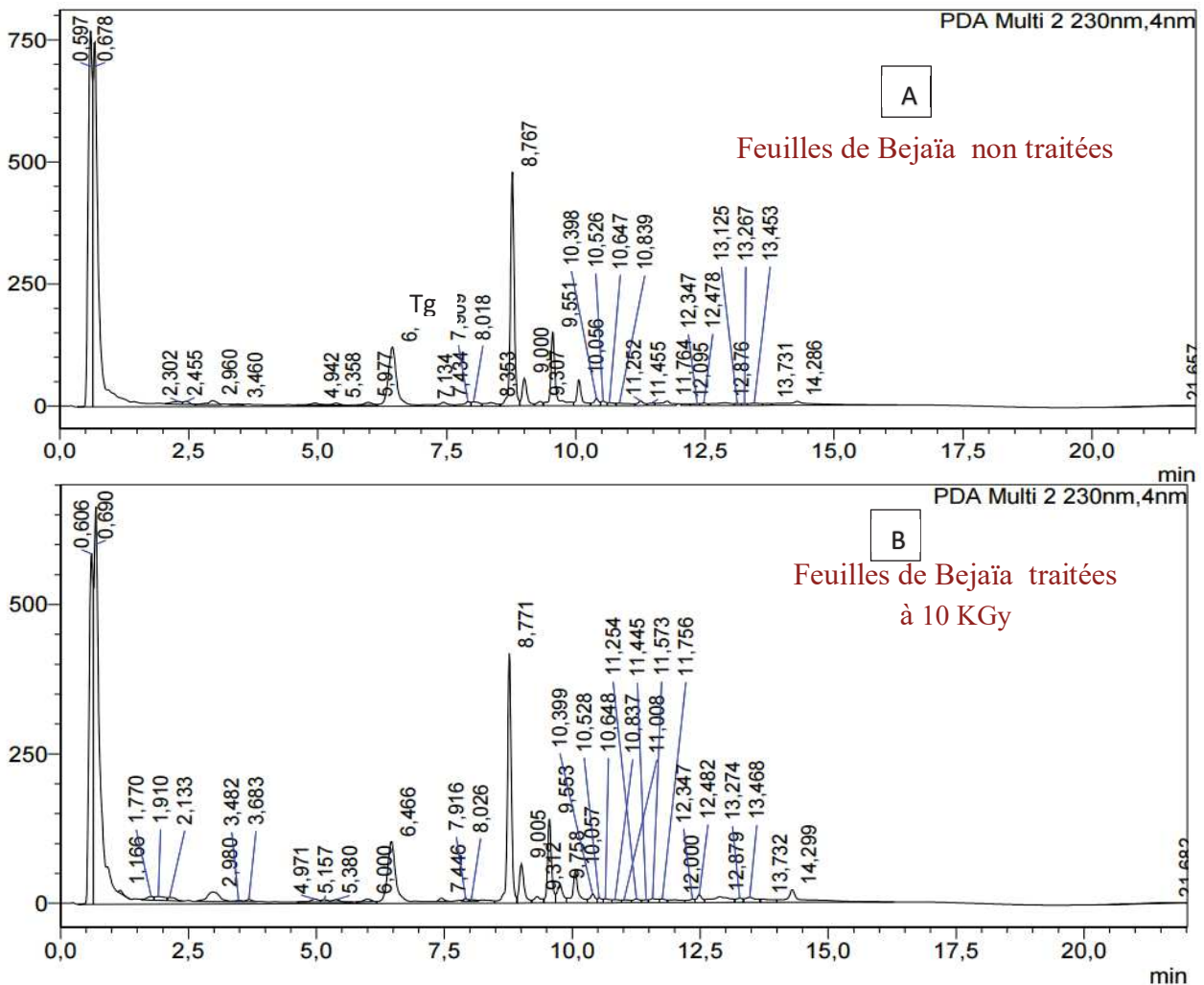
II.2.1. Effet de la technique d'extraction sur la composition en thapsigargins

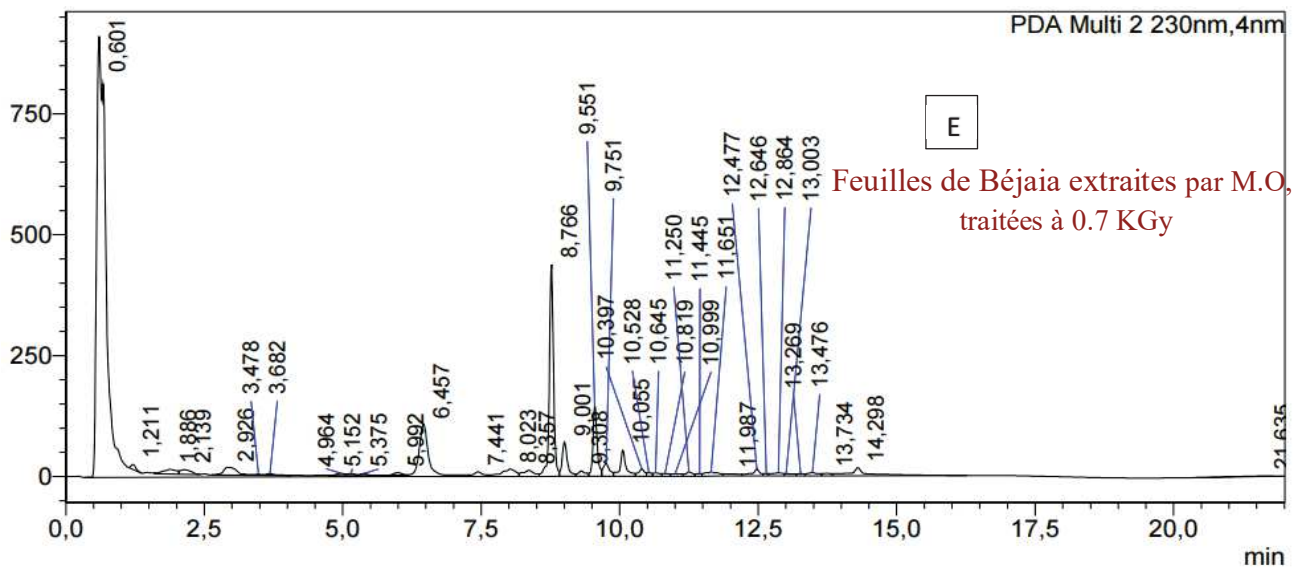
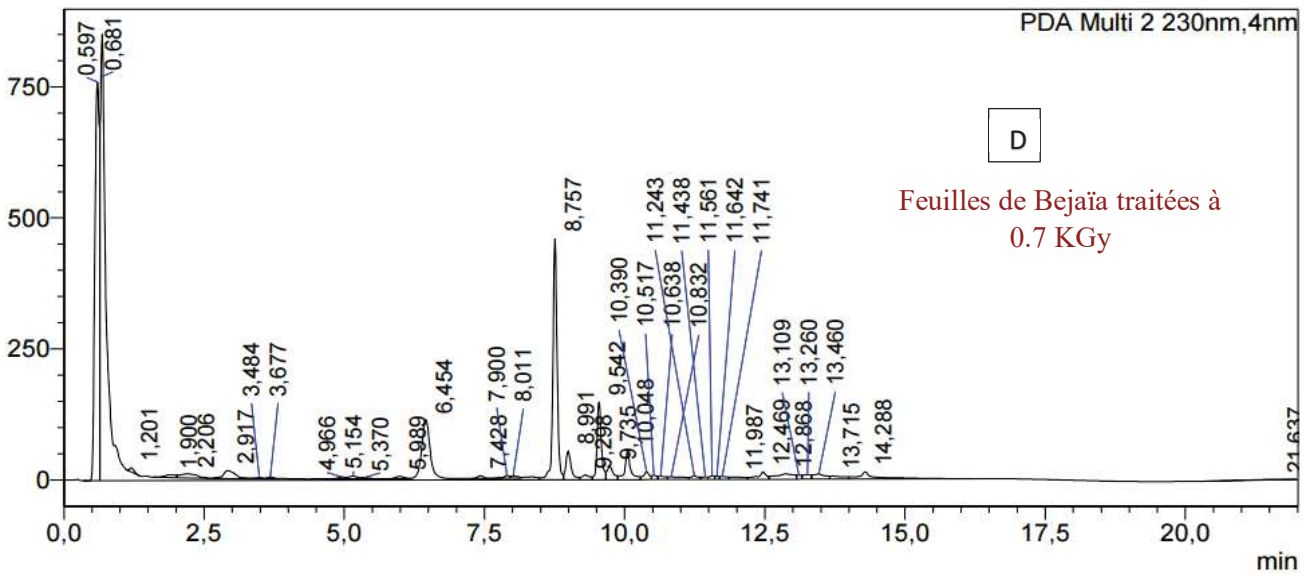
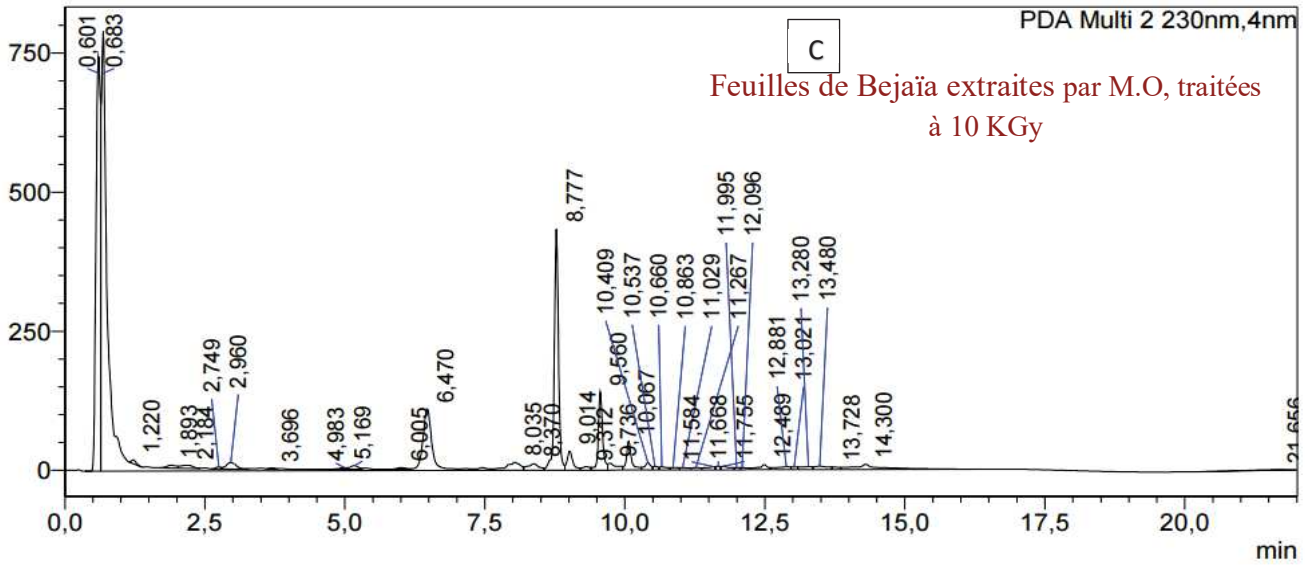
L'objectif de notre étude est de comparer les rendements en thapsigargins (Tg, Tc et Nb) de la plante *Thapsia garganica* extraites à partir des feuilles et des racines, en fonction de la technique d'extraction utilisée. Les méthodes d'immersion de matériaux séchés (température ambiante) ont ensuite été comparées à l'extraction au solvant par micro-onde à haute température afin de détecter s'il y a une éventuelle dégradation thermique des extraits causés par le chauffage intenses des micro-ondes.

Selon les profils des chromatogrammes HPLC (en Annexe), peu de variations phytochimiques ont été observées.

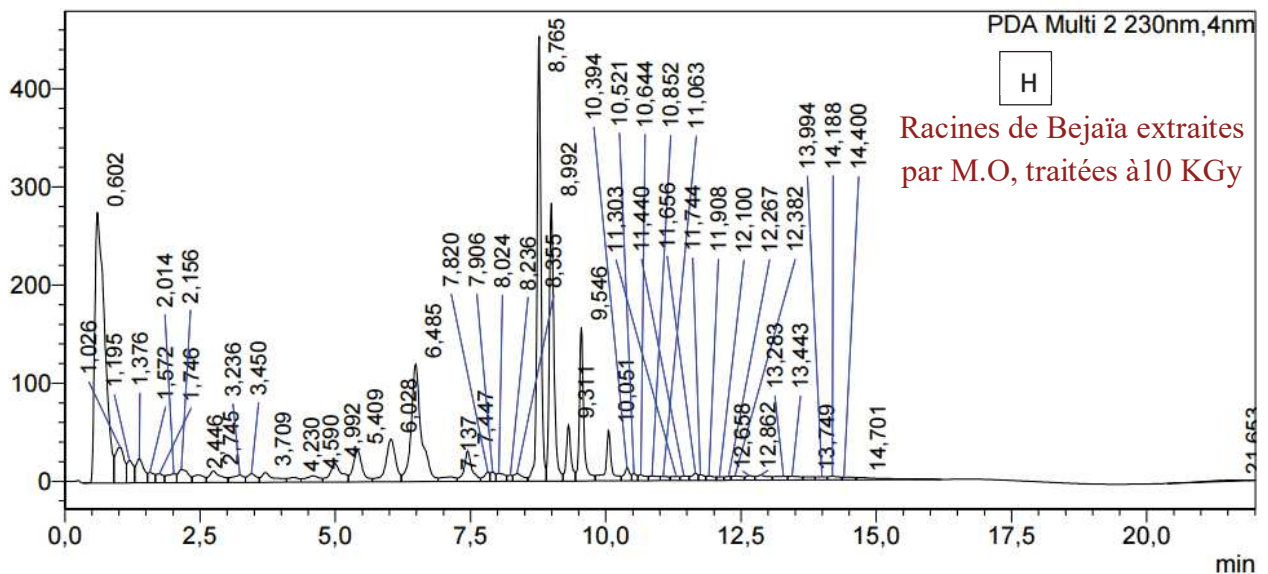
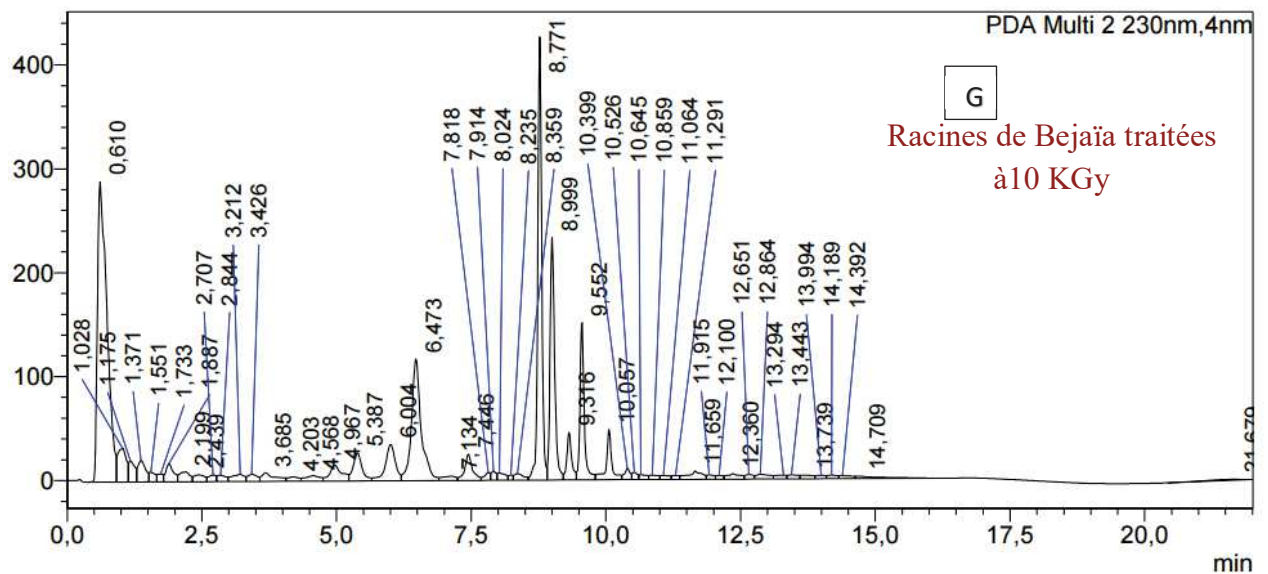
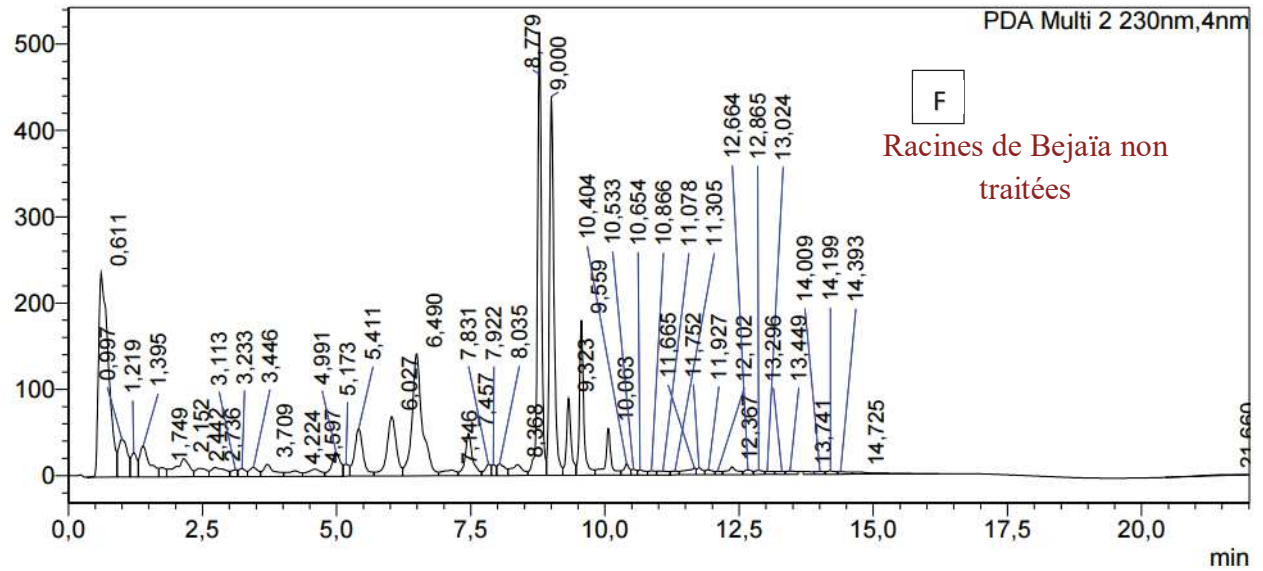
Les Chromatogrammes montrent la présence des trois standards dans tous nos échantillons que ce soit dans les feuilles ou dans les racines, cela est illustré pour tous les échantillons de A à T de la figure 32 :

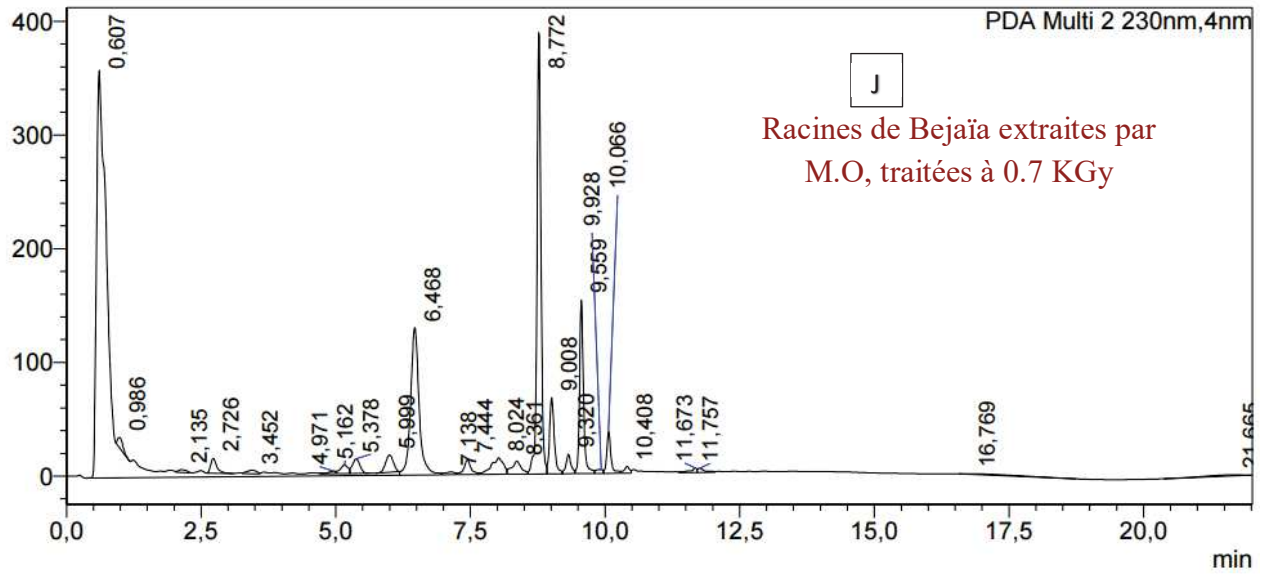
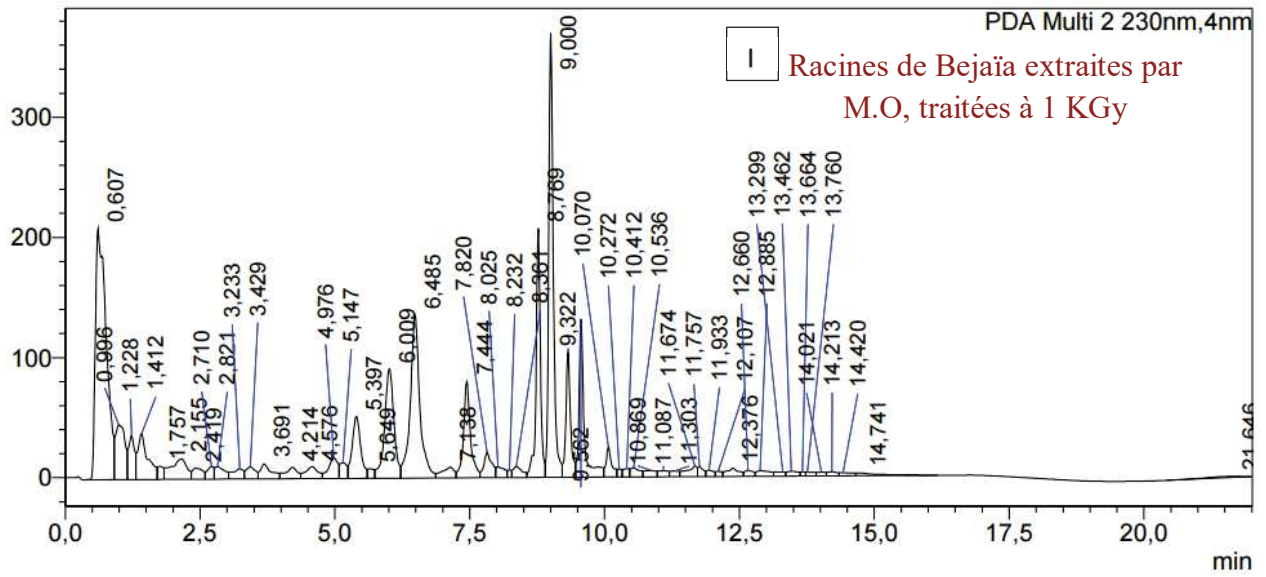
✓ Quelques chromatogrammes des extraits méthanoliques de feuilles de *T.garganica* des échantillons de Béjaia :



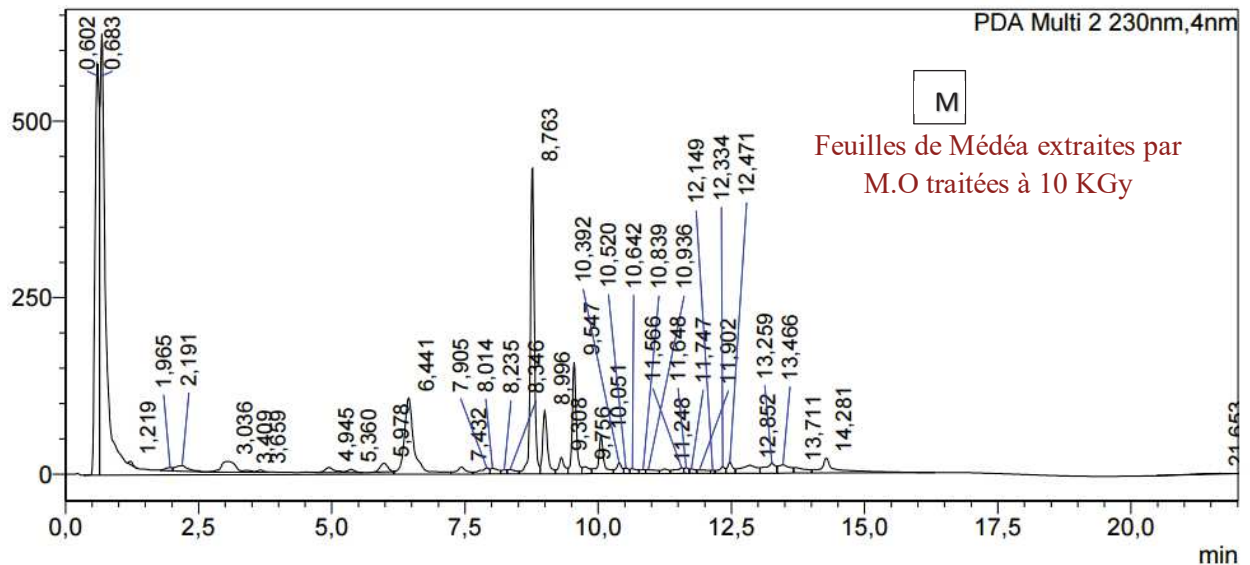
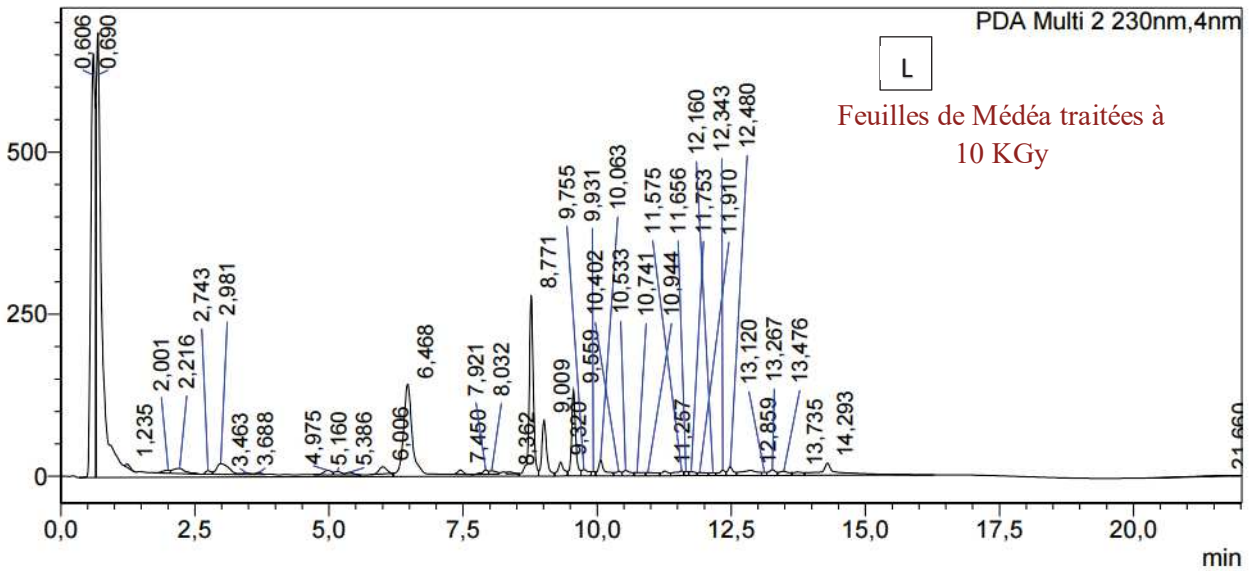
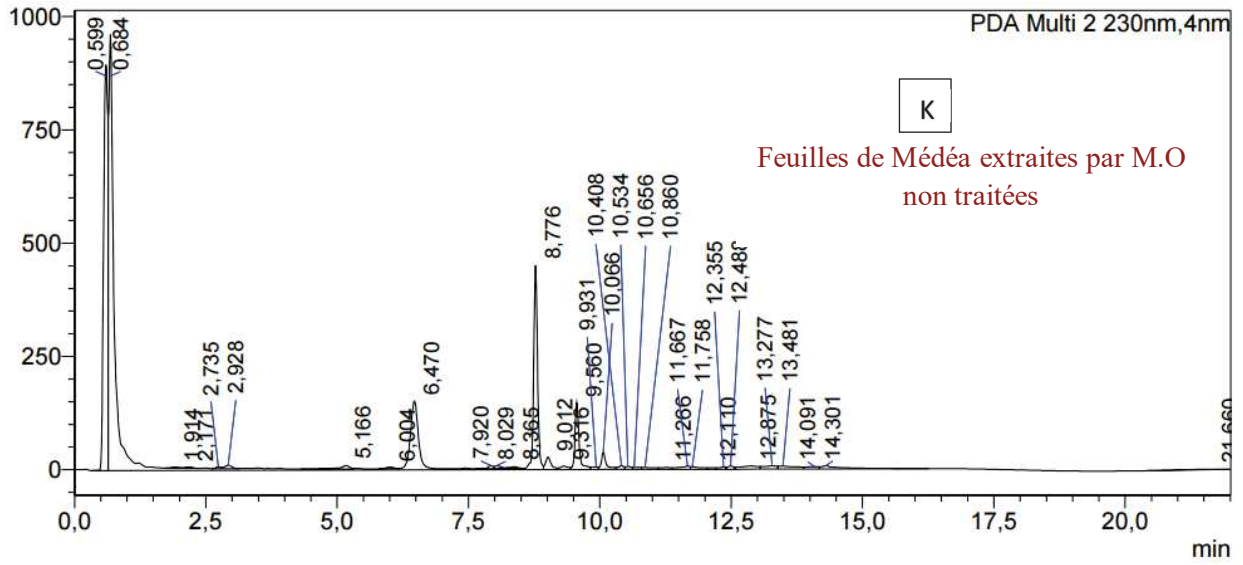


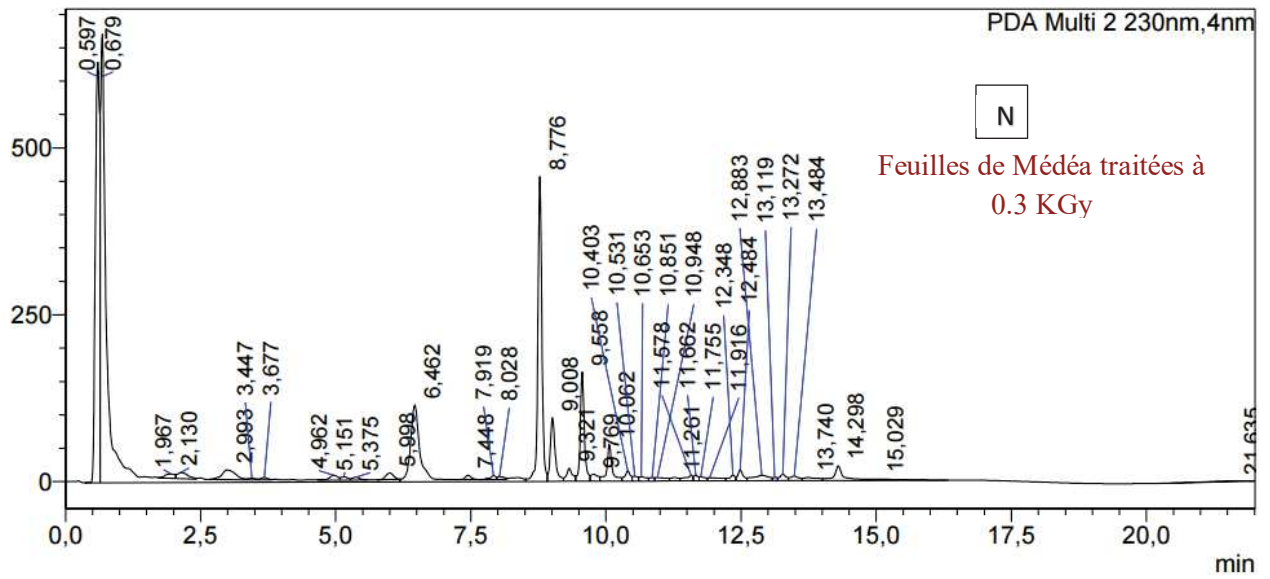
✓ Quelques chromatogrammes des extraits méthanoliques de racines de *T.garganica* des échantillons de Béjaïa :



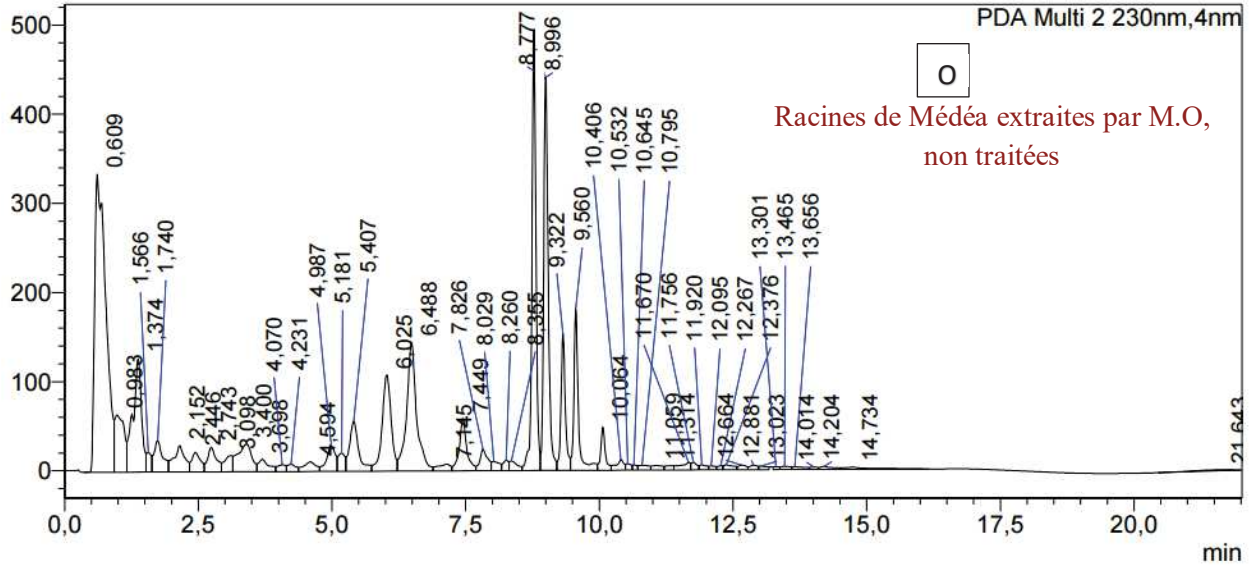


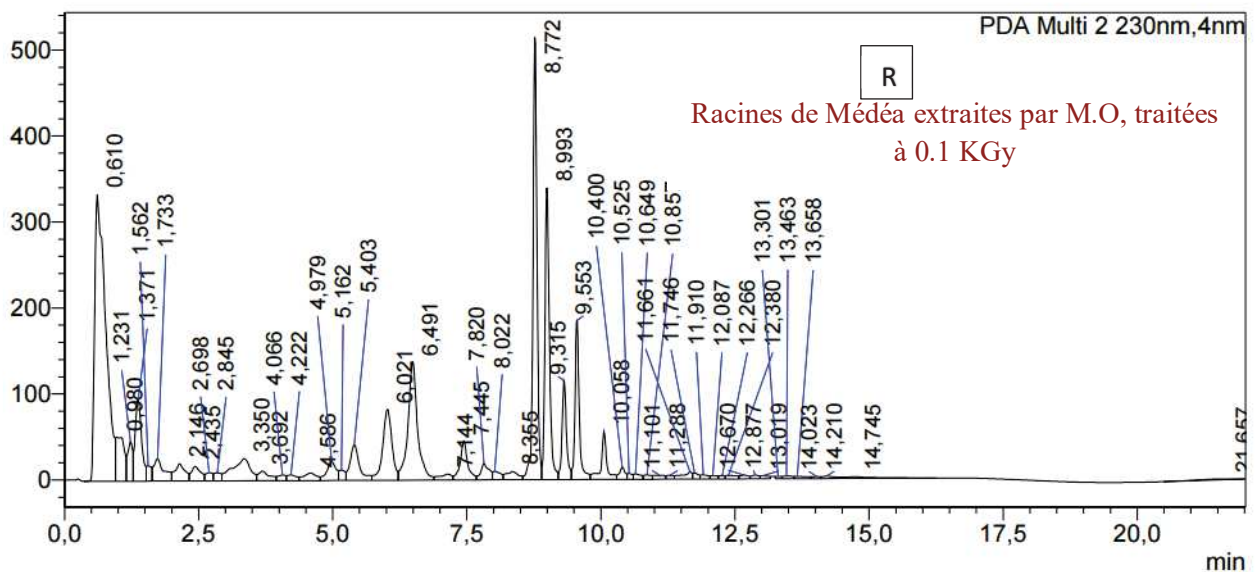
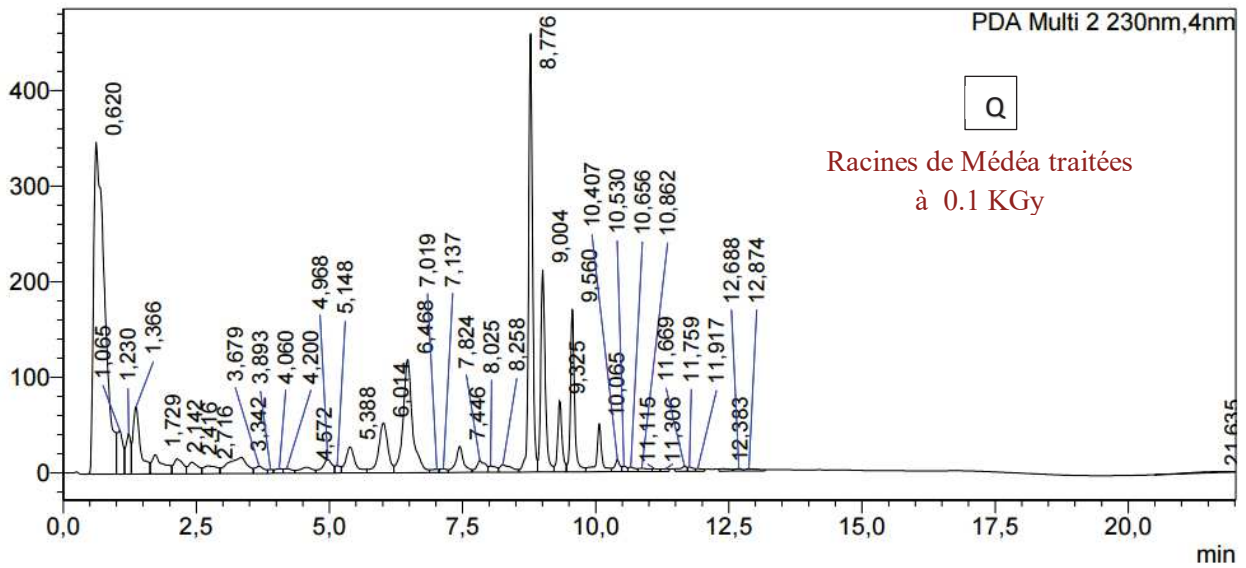
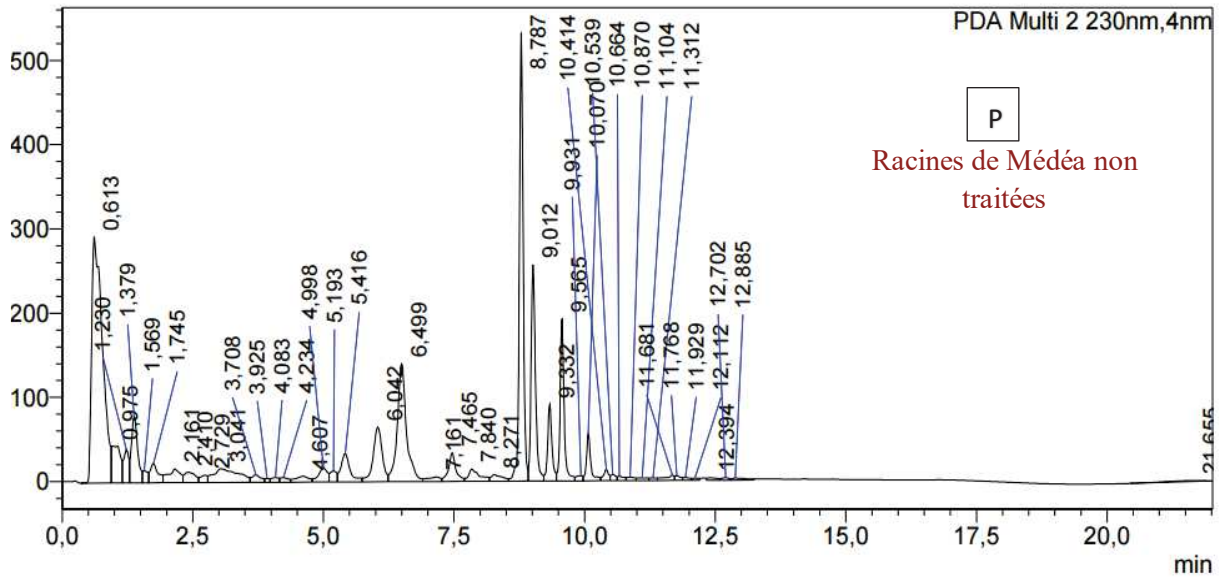
✓ Quelques chromatogrammes des extraits méthanoliques de feuilles de *T.garganica* des échantillons de Médéa :





✓ Quelques chromatogrammes des extraits méthanoliques de racines de *T.garganica* des échantillons de Médéa :





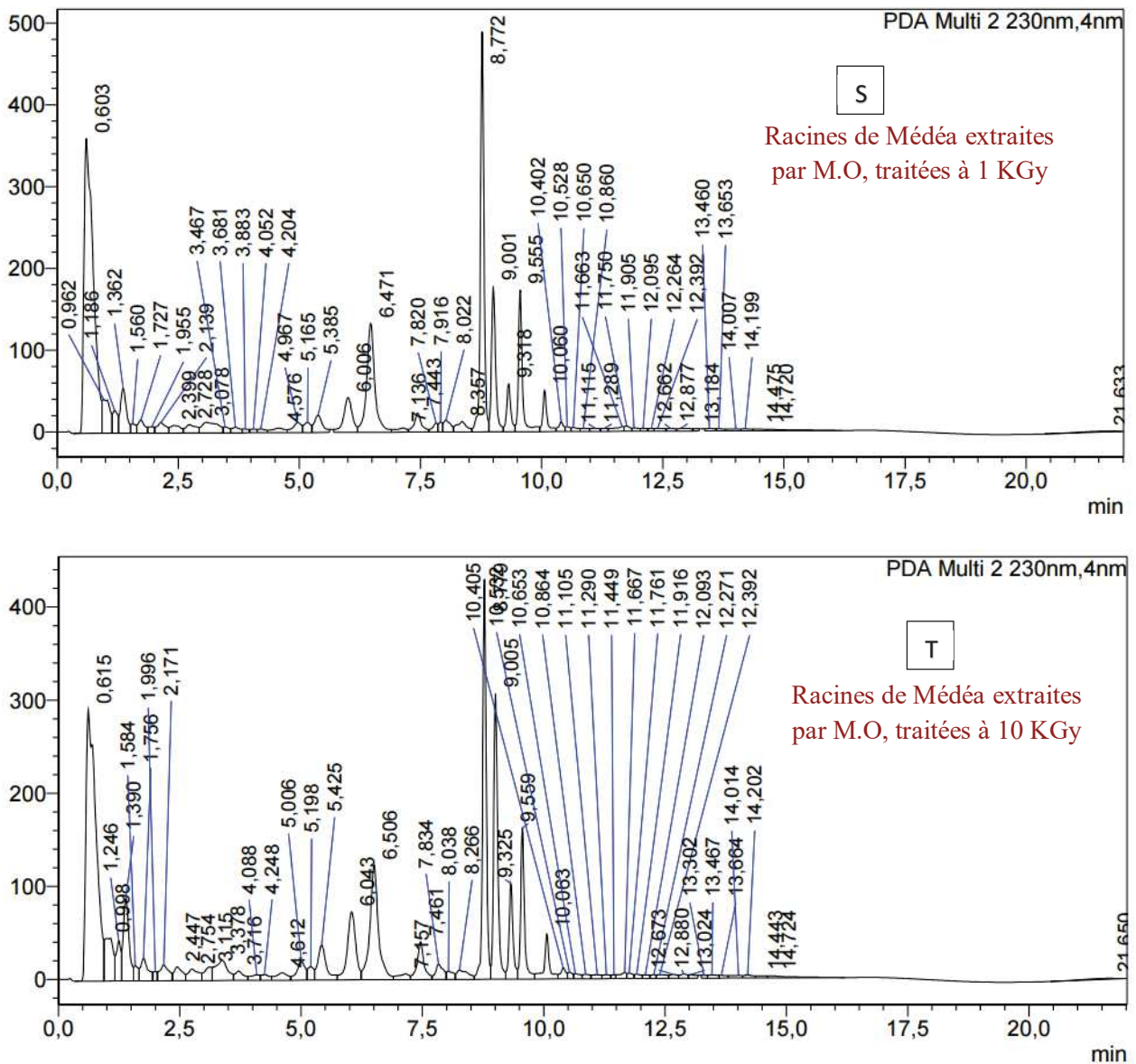


Figure 32 : Présentation des chromatogrammes de quelques échantillons relevant les pics des standards présents dans les extraits de la plante de A à T ;
A à E : feuilles de *T.garganica* de Béjaïa ; **F à J :** racines de *T.garganica* de Béjaïa ; **K à N :** feuilles de *T.garganica* de Médéa ; **O à T :** racines de *T.garganica* de Médéa.

NB : le reste des résultats se trouve en annexe

La teneur en Tg a été détectée dans tous les échantillons de racines (0,5 à 4,9% de MS) et de feuilles (0,2 à 1,5% de MS) de *T.garganica* (**Tableau 7**) et en quantité plus élevée par rapport à Tc (0,3 à 2,4% de MS racinaire et 0,1 à 0,3% de MS de feuilles) et Nb (environ 0,1% de MS, sauf pour les extraits de Bejaïa dont il peut atteindre 0,3% de MS). Les racines séchées de *T.garganica* étaient donc riches en Tg en comparaison avec les feuilles séchées (**Fig.33**).

Tableau 7 : Effet de la méthode d'extraction et des doses d'irradiation gamma sur la contenance en thapsigargins (%MS) dans les échantillons de *T. garganica*.

	Macération classique MC				Extraction Assistée par Microonde EAM				Extraction Classique EC				
	KGy	MR	MF	BR	BF	MR	MF	BR	BF	MR	MF	BR	BF
Tg	0	1.87±0.25 ^{ag}	0.62±0.09 ^b	4.28±1.24 ^{cg}	0.45±0.08 ^d	2.44±1.85 ^{ch}	0.37±0.21	2.40±3.66 ^{fh}	0.50±0.09	0.51±0.89 ^{aci}	0.28±0.22 ^b	1.09±0.36 ^{cfi}	0.19±0.15 ^d
	0.1	2.99±0.43 ^{ag}	1.47±0.10 ^b	4.91±0.64 ^{cg}	0.47±0.34 ^d	2.93±0.60 ^{ch}	0.32±0.04	1.99±0.31 ^{fh}	0.34±0.09	0.72±0.57 ^{aci}	0.26±0.21 ^b	1.48±0.11 ^{cfi}	0.18±0.15 ^d
	0.3	1.79±0.34 ^{ag}	0.53±0.05 ^b	3.68±0.88 ^{cg}	0.77±0.39 ^d	1.33±0.26 ^{ch}	0.63±0.02	2.74±0.96 ^{fh}	0.51±0.13	0.73±0.55 ^{aci}	0.30±0.23 ^b	1.36±0.25 ^{cfi}	0.28±0.23 ^d
	0.7	1.91±0.30 ^{ag}	0.53±0.44 ^b	2.21±0.17 ^{cg}	0.44±0.09 ^d	2.36±0.64 ^{ch}	0.53±0.07	2.66±0.32 ^{fh}	0.64±0.07	0.82±0.60 ^{aci}	0.32±0.25 ^b	0.98±0.31 ^{cfi}	0.28±0.18 ^d
	1	1.32±0.49 ^{ag}	0.96±0.39 ^b	2.12±1.89 ^{cg}	0.63±0.33 ^d	1.43±0.58 ^{ch}	1.10±0.33	3.32±0.30 ^{fh}	0.48±0.10	0.82±0.64 ^{aci}	0.32±0.25 ^b	1.56±0.29 ^{cfi}	0.28±0.24 ^d
	3	2.18±0.28 ^{ag}	0.62±0.18 ^b	2.73±0.16 ^{cg}	0.59±0.08 ^d	2.06±0.25 ^{ch}	0.51±0.14	3.27±0.36 ^{fh}	0.60±0.09	0.81±0.60 ^{aci}	0.26±0.19 ^b	1.11±0.32 ^{cfi}	0.24±0.19 ^d
	7	1.80±0.26 ^{ag}	1.37±0.31 ^b	1.72±0.11 ^{cg}	0.67±0.13 ^d	1.65±0.13 ^{ch}	1.11±0.31	1.60±1.29 ^{fh}	0.48±0.21	0.87±0.67 ^{aci}	0.29±0.23 ^b	1.02±0.24 ^{cfi}	0.26±0.21 ^d
	10	1.54±1.03 ^{ag}	0.73±0.07 ^b	1.41±0.13 ^{cg}	0.67±0.03 ^d	2.70±0.60 ^{ch}	0.61±0.07	1.96±0.24 ^{fh}	0.53±0.10	0.82±0.60 ^{aci}	0.31±0.23 ^b	1.18±0.19 ^{cfi}	0.28±0.23 ^d
	0	0.57±0.35 ^{ag}	0.09±0.04 ^b	1.07±0.53 ^{cg}	0.14±0.08 ^d	1.13±0.35 ^{ch}	0.13±0.14	5.68±5.52 ^{fh}	0.20±0.08	0.47±0.10 ^{aci}	0.11±0.09 ^b	0.54±0.25 ^{cfi}	0.05±0.04 ^d
	0.1	1.09±0.23 ^{ag}	0.46±0.12 ^b	2.38±0.28 ^{cg}	0.07±0.07 ^d	1.12±0.22 ^{ch}	0.06±0.01	0.89±0.12 ^{fh}	0.15±0.07	0.32±0.28 ^{aci}	0.07±0.07 ^b	0.87±0.15 ^{cfi}	0.13±0.09 ^d
Tc	0.3	0.67±0.10 ^{ag}	0.13±0.07 ^b	2.05±0.49 ^{cg}	0.22±0.19 ^d	0.50±0.07 ^{ch}	0.15±0.07	0.68±0.29 ^{fh}	0.13±0.06	0.35±0.29 ^{aci}	0.07±0.06 ^b	0.30±0.53 ^{cfi}	0.01±0.08 ^d
	0.7	0.73±0.11 ^{ag}	0.16±0.22 ^b	1.25±0.08 ^{cg}	0.09±0.04 ^d	0.89±0.19 ^{ch}	0.14±0.07	1.04±0.67 ^{fh}	0.24±0.08	0.32±0.33 ^{aci}	0.10±0.08 ^b	0.78±0.12 ^{cfi}	0.10±0.07 ^d
	1	0.50±0.17 ^{ag}	0.21±0.12 ^b	1.01±0.96 ^{cg}	0.19±0.15 ^d	0.56±0.23 ^{ch}	0.26±0.18	1.85±0.19 ^{fh}	0.13±0.09	0.40±0.38 ^{aci}	0.07±0.06 ^b	0.73±0.64 ^{cfi}	0.10±0.08 ^d
	3	0.83±0.13 ^{ag}	0.21±0.12 ^b	1.54±0.07 ^{cg}	0.14±0.05 ^d	0.79±0.08 ^{ch}	0.07±0.01	1.86±0.23 ^{fh}	0.17±0.10	0.38±0.31 ^{aci}	0.06±0.05 ^b	0.43±0.45 ^{cfi}	0.10±0.08 ^d
	7	0.68±0.09 ^{ag}	0.63±0.21 ^b	0.54±0.03 ^{cg}	0.21±0.09 ^d	0.63±0.04 ^{ch}	0.29±0.07	0.46±0.39 ^{fh}	0.15±0.15	0.47±0.42 ^{aci}	0.07±0.05 ^b	0.43±0.05 ^{cfi}	0.09±0.08 ^d
	10	0.59±0.36 ^{ag}	0.19±0.07 ^b	0.41±0.07 ^{cg}	0.10±0.02 ^d	1.03±0.22 ^{ch}	0.11±0.01	0.62±0.09 ^{fh}	0.06±0.08	0.37±0.28 ^{aci}	0.09±0.08 ^b	0.59±0.13 ^{cfi}	0.10±0.08 ^d
	0	0.01±0.20 ^{ag}	0.10±0.16 ^b	0.27±0.50 ^{cg}	0.01±0.27 ^d	0.33±0.70 ^{ch}	0.10±0.21	1.14±1.32 ^{fh}	0.07±0.01	0.13±0.25 ^{aci}	0.13±0.13 ^b	0.15±0.12 ^{cfi}	0.01±0.01 ^d
	0.1	0.19±0.24 ^{ag}	0.02±0.94 ^b	0.76±0.53 ^{cg}	0.01±0.33 ^d	0.01±0.12 ^{ch}	0.01±0.40	0.11±0.16 ^{fh}	0.07±0.36	0.01±0.01 ^{aci}	0.01±0.01 ^b	0.33±0.05 ^{cfi}	0.27±0.33 ^d
	0.3	0.01±0.02 ^{ag}	0.16±0.41 ^b	0.18±0.07 ^{cg}	0.32±0.92 ^d	0.10±0.23 ^{ch}	0.01±0.00	0.04±0.10 ^{fh}	0.06±0.44	0.17±0.32 ^{aci}	0.01±0.00 ^b	0.31±0.13 ^{cfi}	0.20±0.38 ^d
	0.7	0.01±0.04 ^{ag}	0.01±0.19 ^b	0.10±0.02 ^{cg}	0.01±0.54 ^d	0.02±0.65 ^{ch}	0.01±0.00	0.07±0.05 ^{fh}	0.08±0.75	0.21±0.38 ^{aci}	0.03±0.09 ^b	0.26±0.23 ^{cfi}	0.30±0.00 ^d
Nt	1	0.01±0.17 ^{ag}	0.01±0.00 ^b	0.01±0.38 ^{cg}	0.07±0.97 ^d	0.04±0.17 ^{ch}	0.01±0.00	0.16±0.05 ^{fh}	0.16±0.52	0.11±0.15 ^{aci}	0.01±0.00 ^b	0.21±0.18 ^{cfi}	0.53±0.63 ^d
	3	0.01±0.04 ^{ag}	0.01±0.06 ^b	0.22±0.04 ^{cg}	0.01±0.73 ^d	0.08±0.34 ^{ch}	0.01±0.00	0.34±0.13 ^{fh}	0.01±0.16	0.01±0.16 ^{aci}	0.01±0.00 ^b	0.31±0.17 ^{cfi}	0.46±0.53 ^d
	7	0.06±0.19 ^{ag}	0.01±0.20 ^b	0.01±0.04 ^{cg}	0.27±0.66 ^d	0.04±0.20 ^{ch}	0.01±0.08	0.06±0.41 ^{fh}	0.01±0.50	0.01±0.00 ^{aci}	0.01±0.01 ^b	0.29±0.20 ^{cfi}	0.32±0.51 ^d
	10	0.01±0.17 ^{ag}	0.01±0.00 ^b	0.08±0.19 ^{cg}	0.07±0.78 ^d	0.09±0.42 ^{ch}	0.01±0.00	0.25±0.08 ^{fh}	0.01±0.28	0.04±0.09 ^{aci}	0.01±0.00 ^b	0.22±0.25 ^{cfi}	0.25±0.43 ^d

Comparaison de différentes méthodes extraction et doses irradiation gamma sur les échantillons des deux régions étudiées Médéa et Béjaia. Les valeurs sont les moyennes des triplicatas ± standard déviation (SD) et sont exprimées en pourcentage de composés dans le matériel végétal sec (MS%), (P<0.05).

Tg=Thapsigargine, Tc=Thapsigargicine, Nb=Nortrilobolide, MC=macération classique, EAM=Extraction assistée par Microonde, EC=Extraction Classique en utilisant de l'azote liquide pour le broyage, MR=Médéa racines, MF=Médéa feuilles, BR=Béjaia racines, BF=Béjaia feuilles.

Les doses de l'irradiation Gamma sont données en KGy, signifiante (P<0.05) en comparaison avec le control (0KGy). Les lettres supérieures dans la même rangée indiquent des différences significatives (P <0,05) dans les rendements composés entre les méthodes d'extraction.

II.2.1.1. Méthode d'extraction par macération

Ainsi selon nos résultats (**Tableau 7**), la Tg était plus abondante dans les échantillons de racines de Béjaia (D₀:4,28%); par rapport aux échantillons d'extrait de Médéa (D₀: 1,87%); Le composé Tg a également été détecté dans les échantillons de feuilles de Béjaia (D₀: 0,45%) et de Médéa (D₀: 0,62) mais avec de petites quantités par rapport aux racines (**Tableau 7**).

En outre, nous avons noté une diminution du pourcentage de Tg dans les feuilles séchées de *T.garganica* traitée par l'application des rayonnements gamma (**Fig.33**). D'autre part, la quantité de Tg dans les racines séchées de *T.garganica* de Béjaia et Médéa a légèrement diminué en fonction des doses d'irradiation (Béjaia: D₁:4,91 ; D₂:3,68 ; D₃:2,21 ; D₄:3,21 ; D₅:2,73 ; D₆:1,72 et D₇:1,41%), (Médéa: D₁:2,99 ; D₂:1,79 ; D₃:1,91 ; D₄:1,32 ; D₅:2,18; D₆:1,80 ; D₇: 1,54%). Cependant, pour le contenu des feuilles en Tg, les échantillons de Béjaia (D₁:0,47 ; D₂:0,77 ; D₃:0,44 ; D₄:0,63 ; D₅:0,59 ; D₆:0,67 ; D₇:0,67%) et Médéa (D₁:1,47 ; D₂:0,53 ; D₃:0,53 ; D₄:0,96 ; D₅:0,62 ; D₆ :1,37 et D₇:0,73%) présentent une fluctuation plus importante en fonction des doses d'irradiation. Comme montré, la thapsigargicine Tc est l'un des sesquiterpènes lactones (STL) présents dans nos échantillons (**Fig.34**) isolés à différents pourcentages dans les racines de *T. garganica* Béjaia (D₀: 1,07%) et Médéa (D₀: 0,57%). Pour la même méthode d'extraction, la teneur en Tc dans les feuilles était de 0,14% et 0,27% dans les extraits Béjaia et Médéa respectivement.

Pour les faibles doses (D₁:2,38 ; D₂:2,05 ; D₃:1,25 ; D₄:1,78 ; D₅:1,54%), le traitement gamma a augmenté la teneur en Tc dans les extraits de racines de Béjaia, à l'exception de D₆:0,54 et D₇:0,41%. Cette fluctuation est moins importante pour les échantillons de Médéa (D₁:1,09 ; D₂:0,67 ; D₃:0,73 ; D₄:0,50 ; D₅:0,83 ; D₆:0,68 ; D₇:0,59%) voir même stable (**Fig.34**). Ainsi, D₁ est considérée comme la dose optimale pour isoler la quantité la plus élevée de Tc à partir des racines de *T. garganica* pour les deux zones.

Peu de quantité en Tc des extraits de feuilles de *T.garganica* de Béjaia (D₀:0,27%) et Médéa (D₀:0,17%) a été détectée, mais une augmentation en Tc à une dose de 7K Gy (0,63%) a été observée pour les extraits de feuilles de Médéa. Alors que l'augmentation de Nb a été observée à D₂ (0,16%), D₂ (0,32%) et D₇ (0,62%) dans des extraits de feuilles de Médéa et Béjaia respectivement (**Fig.35**). Il semble que le Nb soit plus localisé et abondant dans les extraits de racines de Béjaia (0,27%) (Absent dans les feuilles à D₀) et de feuilles de Médéa (0,12%) (Absent dans les racines de Médéa à l'exception de l'extrait traité à D₁ (0,19%)). Les résultats ont montré que le Nortrilobolide était trop radiosensible et que son taux était négligeable par rapport au Tg et au Tc. Ainsi il est important de noter que D₁ (0.1K Gy) était une dose capable d'extraire une quantité maximale de Tg, Tc et Nb.

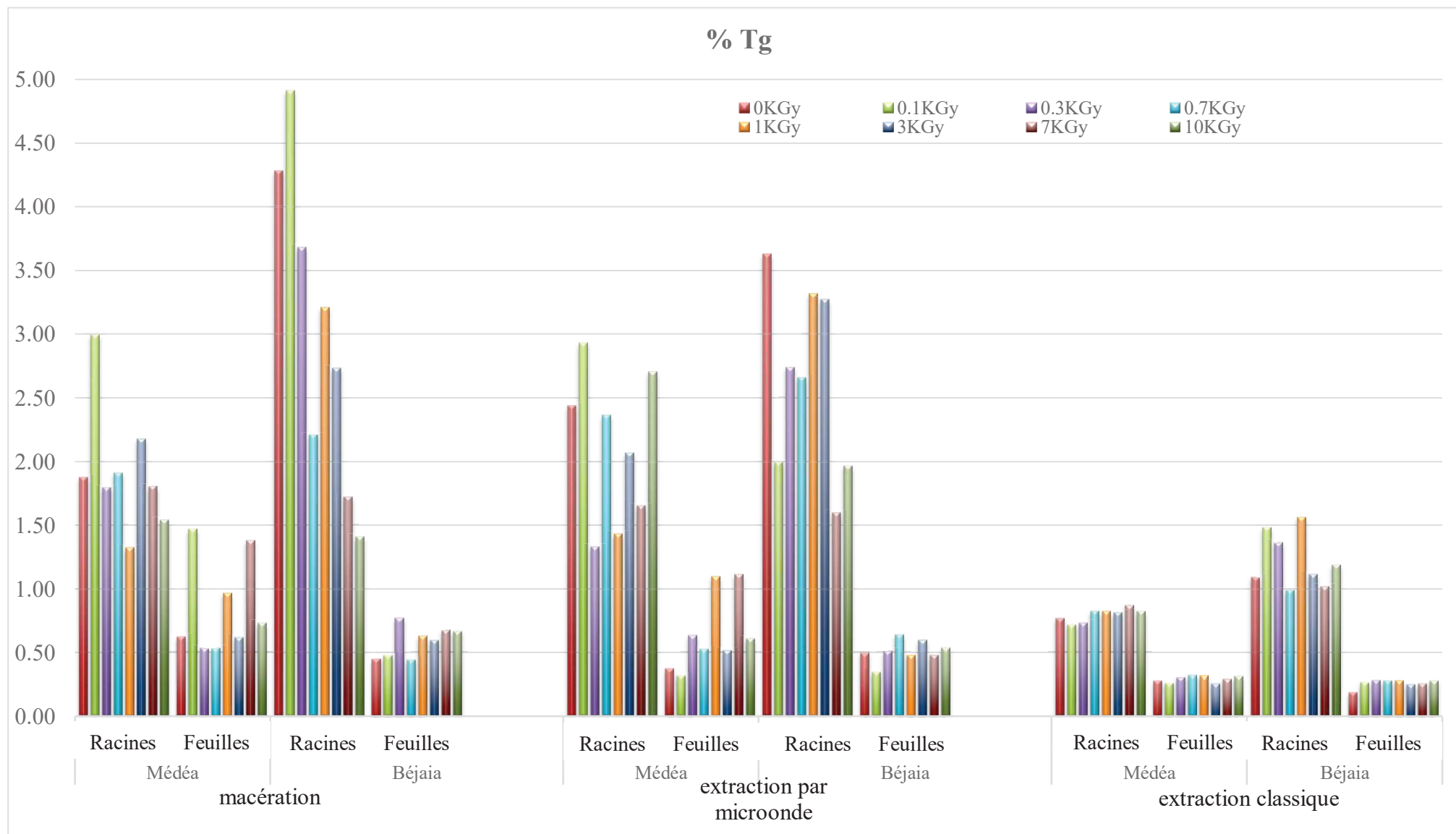


Figure 33: Teneur en Tg (%) des extraits obtenus par différentes méthodes d'extraction et soumises à l'irradiation gamma

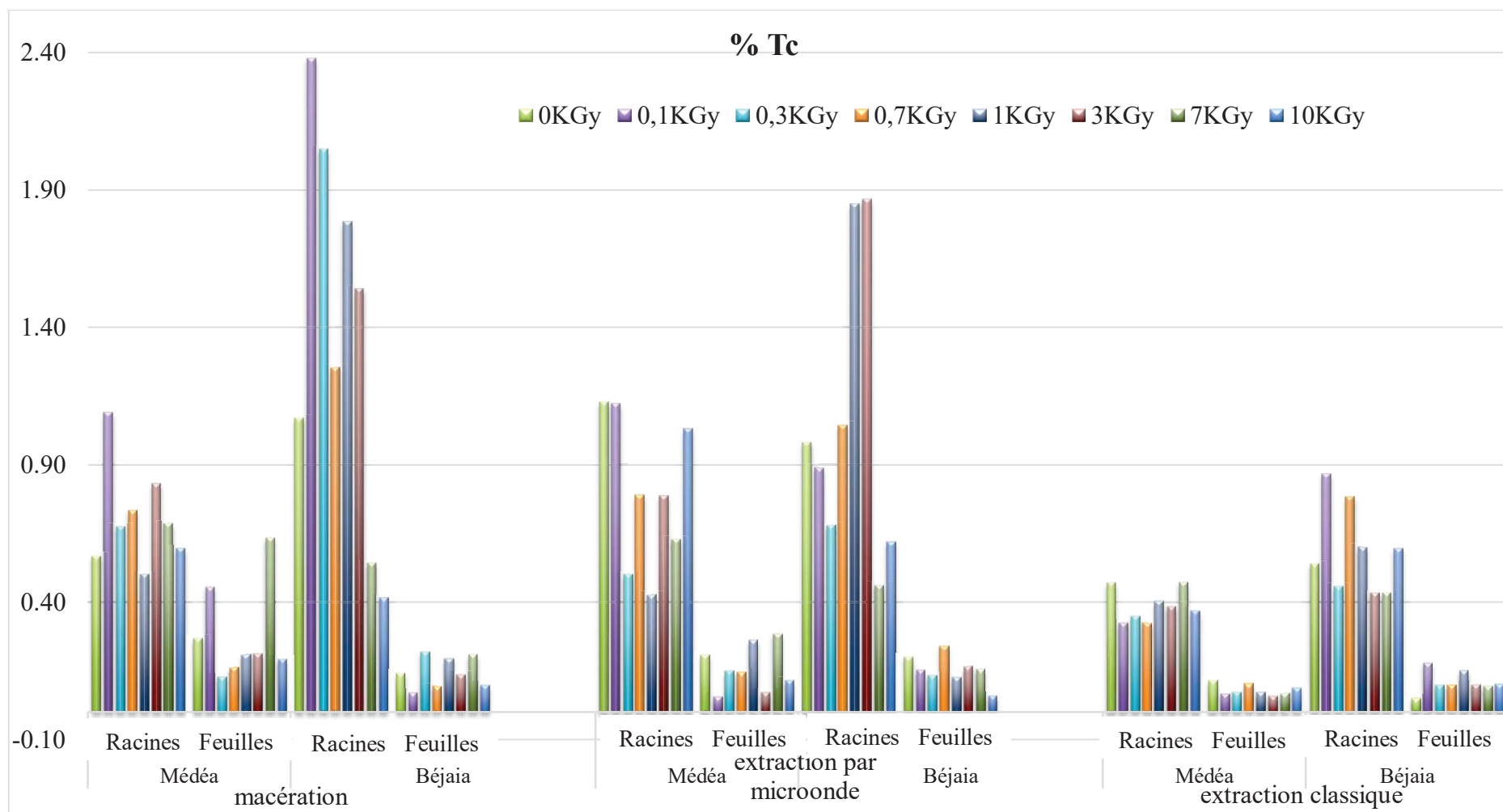


Figure 34: Teneur en Tc (%) des extraits obtenus par différentes méthodes d'extraction et soumises à l'irradiation gamma

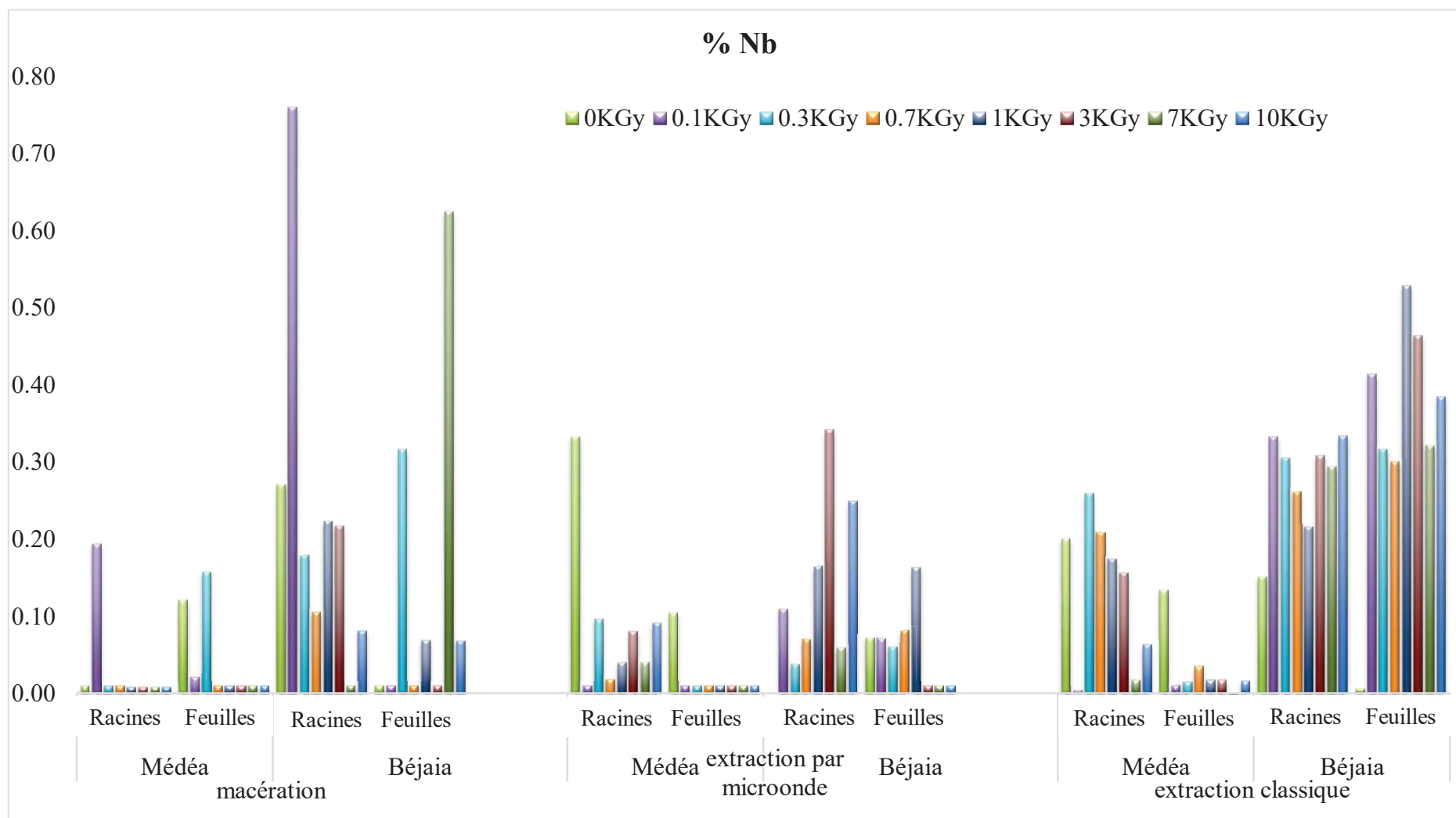


Figure 35: Teneur en Nb (%) des extraits obtenus par différentes méthodes d'extraction et soumises à l'irradiation gamma

II.2.1.2. Méthode d'extraction : extraction au solvant par micro-ondes ESAM

Dans cette partie, les échantillons ont été simultanément soumis aux rayonnements micro-ondes et gamma.

L'extraction assistée par micro-ondes (ESAM) a permis d'extraire plus de Tg des racines (Béjaia: 3,63%, Médéa: 2,44%) que des feuilles (Béjaia: 0,50%, Médéa: 0,37%) (**Fig.33**). Le traitement gamma a montré que les doses de 1K Gy et 3K Gy diminuent la quantité de Tg dans les échantillons de racines de Béjaia à 3.32% et 3.27% respectivement. Alors que le pourcentage est passé à 1,60% à D₆ et 1,96% à D₇. En outre, le taux élevé a été obtenu à partir des extraits de racines de Médéa à D₁: 2,93%, D₃: 2,36% et D₇: 2,70%.

Il est apparu que les feuilles de Béjaia extraites par micro-ondes étaient radio-résistantes en raison des valeurs constantes de Tg obtenues en fonction des doses appliquées (D₁:0,34 ; D₂:0,51 ; D₃:0,64 ; D₄:0,48 ; D₅:0,60 ; D₆:0,48 et D₇:0,53%). Autrement, les valeurs fluctuent légèrement pour les échantillons de feuilles Médéa traités par gamma pour atteindre respectivement 1,10% et 1,11% en D₄ et D₆.

Les mêmes variations ont été observées pour la teneur en Tc dans les échantillons de Béjaia racines (1,13%) et feuilles (0,21%) ; et 0,98%, 0,20% dans les racines et les feuilles de Médéa respectivement. Le changement intéressant a été observé pour les échantillons traités au gamma des extraits de racines de Béjaia avec des teneurs D₄ (1,84%) et D₅ (1,85%) (**Fig. 34**).

Le Nb a été particulièrement observé dans les extraits de racines de Médéa (0,33%) et absent chez ceux de Béjaia. Lorsque les échantillons ont été traités avec des rayonnements gamma, la quantité de Nb est de 0,34% à 3K Gy dans les extraits racinaires de Médéa. L'augmentation en doses de radiation a diminué la quantité de Nb (en traces) dans les échantillons de feuilles de Médéa, ce qui a expliqué la sensibilité du composé au traitement gamma et aux micro-ondes.

II.2.1.3. Méthode d'extraction classique après broyage avec de l'azote liquide (EC)

Tg et Tc se situent principalement dans les racines de *T.garganica* de Béjaia 1,09% et 0,54% respectivement, et 0,19% et 0,05% respectivement dans les feuilles. Tandis que la teneur en Tg et Tc de *T.garganica* est plus importante dans les échantillons de feuilles de Médéa (0,28 et 0,11% respectivement).

Une radiorésistance élevée a été observée dans les composés de Tg et Tc avec des rayonnements gamma, les quantités changent légèrement en comparant les échantillons non traités. (**Fig.33 et Fig.34**). Par conséquent, Tg et Tc étaient stables aux doses allant de D₁ à D₇ (0,77; 0,72; 0,73 ; 0,82; 0,82; 0,81; 0,87; 0,82% et 0,32; 0,35; 0,32 ;0,40; 0,38; 0,47; 0,37% respectivement) dans les racines de Médéa. Cette stabilité a également été démontrée dans les

extraits de feuilles traitées à la fois à partir de Béjaia et Médéa. Cette observation n'est pas en accord avec les données de la littérature indiquant que les traitements d'irradiation gamma et micro-ondes induisent de forts changements dans le profil d'huile essentielle (**Antonelli et al.,1998**).

De plus, les extraits de racines de Béjaia présentent quelques fluctuations. En effet, le taux en Tg a augmenté de 1,09% (D₀) à 1,48, 1,36 et 1,56% pour D₁, D₂ et D₄ respectivement. (**Fig.33**). Alors que Tc a augmenté à D₃ (0,78%) et D₁ (0,87%) seulement (**Fig.34**).

Nortrilobolide Nb est détecté en quelques quantités avec la méthode EC (**Fig. 35**) et présent en pourcentage relativement élevé dans les échantillons de *T.garganica* de Béjaia, pratiquement avec le même pourcentage dans les racines et les feuilles traitées par gamma.

Le traitement par gamma a fait augmenter la quantité de 0,15% (D₀) à 0,3% (D₂) pour les échantillons de racines de Béjaia. Ce composé totalement absent dans les extraits de feuilles de Béjaia (à D₀) atteint un pourcentage variant de 0,4% à 0,5%. Au contraire, dans les extraits de feuilles de Médéa, la quantité de Nb varie de 0,13% à 0% après le traitement (de D₁ à D₇).

En outre, nous avons noté une faible fluctuation de la quantité de Nb dans la partie de la plante selon les doses appliquées, cela est lié à la non-stabilité de Nb en particulier lorsqu'il a été soumis à des radiations, étant donné que moins de 0,01% de ce composé est observé dans les échantillons extraits des racines de Médéa (**Fig.35**).

Les résultats montrent que pour l'ensemble des trois méthodes d'extraction, l'irradiation gamma n'a eu aucun effet significatif sur la composition phytochimique des extraits obtenus à partir de *T. garganica* (**Figure 36/ 2A, Tableau 7, Tableau 8**). La thapsigargine est aujourd'hui isolée à partir d'une plante cultivée à Ibiza (Espagne) et expédiée dans le monde entier pour l'extraction. Nous pouvons suggérer qu'à l'avenir le matériel végétal peut être stérilisé en toute sécurité par irradiation gamma et ainsi contribuer à la conservation du produit pendant le transport.

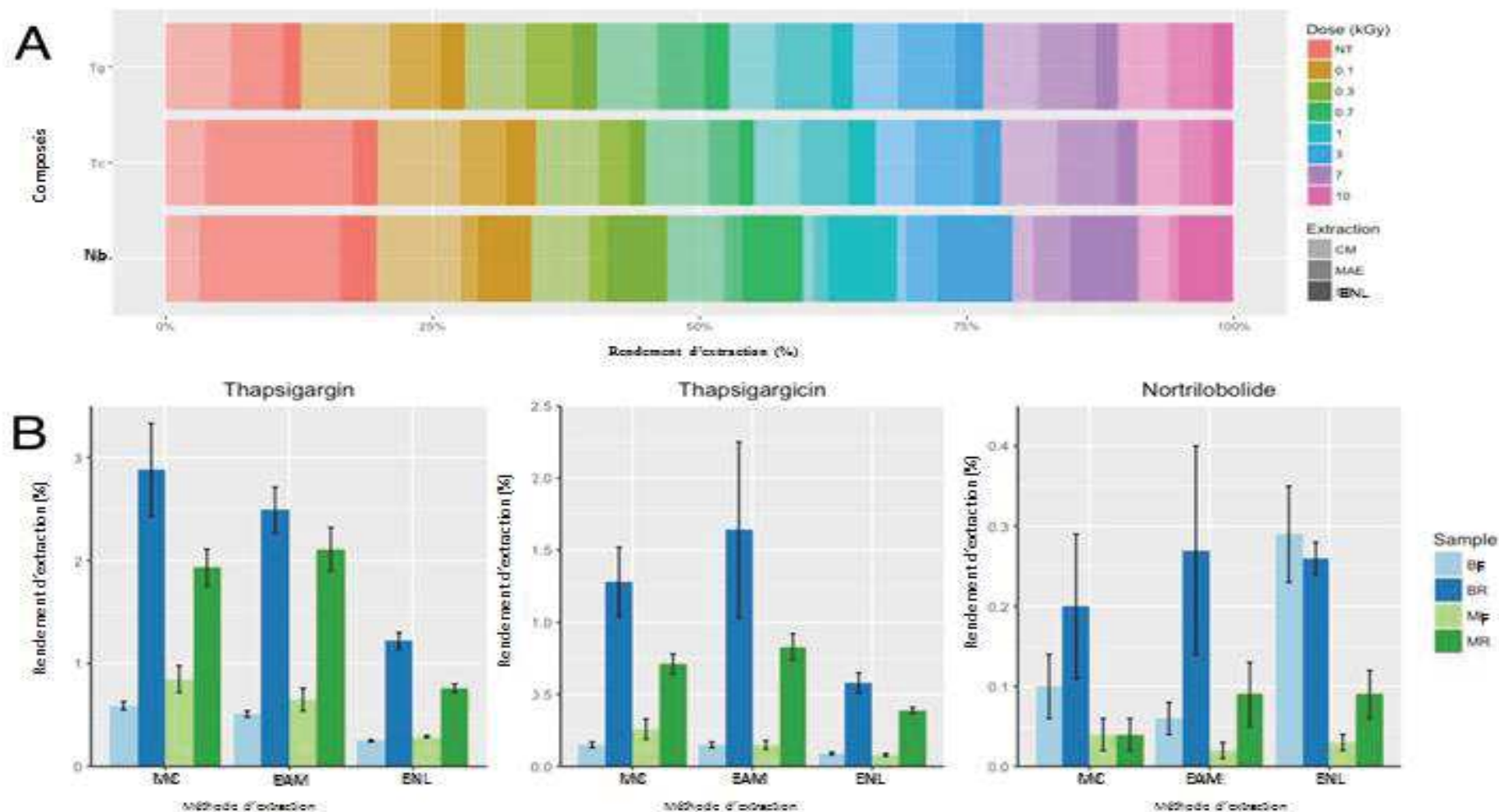


Figure 36 : A - Diagramme à barres empilées montrant l'effet de l'irradiation gamma sur les niveaux de thapsigargine (Tg), de thapsigargin (Tc) et de nortrilobolide (Nb) dans les différents extraits obtenus par les différentes méthodes d'extraction. La dose d'irradiation utilisée est indiquée en KGy avec le témoin (NT = pas traitement gamma) et chaque extraction est représentée en différentes couleurs. Les quantités présentées sont relatives aux échantillons individuels. Pour chaque dose d'irradiation, les méthodes d'extraction sont représentées avec l'ombrage le plus clair étant la macération classique (MC), l'ombrage moyen est l'extraction assistée par micro-ondes (EAM) et l'ombrage le plus foncé est l'extraction classique (EC) en utilisant l'azote liquide pour le broyage (BNL). La taille des carrés indique en pourcentage de rendement d'extraction, comment le composé individuel a été trouvé par les trois différentes extractions avec les différents traitements. B - Diagrammes montrant l'effet des méthodes d'extraction utilisées sur le rendement d'extraction de la thapsigargine (Tg), de la thapsigargin (Tc) et du nortrilobolide (Nb) dans des échantillons provenant des deux sites. MR = racines de Médéa, MF = feuilles de Médéa, BR = racines de Béjaia, BF = feuilles de Béjaia. Dans les tableaux, la quantité de composés a été calculée comme le pourcentage du composé dans le poids sec de la matière végétale (rendement d'extraction).

La figure 36-B illustre l'effet des méthodes d'extraction sur les extraits chimiques, qui se sont révélés significativement différents l'un par rapport à l'autre dans les extraits de racines (valeur $F=7,21$, valeur $P=0,001$) et extraits de feuilles (valeur $F=4,47$, Valeur $P=0,01$) (**Tableau 5**). L'extraction classique (EC) des racines et feuilles séchées de *T.garganica* s'est avérée être la méthode la moins efficace pour extraire des composés bioactifs de petites quantités de matériel végétal, sans différence significative entre l'extraction assistée par micro-ondes et la macération classique.

La méthode EAM présente cependant l'avantage d'être rapide et reproductible et de nécessiter moins d'énergie que les méthodes conventionnelles comme la macération classique (MC) (**Azwanida, 2015**). L'EAM est connu pour provoquer la dégradation thermique de certains analytes, mais ici, il s'est avéré être une méthode appropriée pour l'extraction des thapsigargins comme suggéré précédemment (**Benkaci-Ali et al., 2006**). Les seules variations chimiques observées entre les différents extraits étaient que la teneur en Tg dans les feuilles et les racines était plus élevée que celle en Tc et Nb; Les racines séchées de *T. garganica* ont des taux significativement plus élevés en Tg que dans les feuilles séchées ($P < 0,00$, **Fig.36-B**). Le Nb était le composé le moins abondant dans tous les échantillons. Cela a déjà été rapporté (**Smitt et al., 1995**), mais de nouvelles localités ont été étudiées dans cette étude.

Des différences claires ont également été observées entre les deux régions étudiées pour les racines uniquement, les extraits de racines de la région de Béjaia présentant systématiquement des quantités plus importantes des trois composés étudiés (**Fig.36-B**), ce qui a été démontré en utilisant l'analyse ANOVA (**Tableau 8**). Il a déjà été démontré que la localité a un effet sur la composition phytochimique des racines de *T. garganica* (**Drew et al., 2012, Smitt et al., 1995**), mais là où les causes de ces variations n'ont pas encore été identifiées. Nous émettons l'hypothèse qu'il existe des facteurs biologiques et environnementaux responsables de ces fluctuations. Des études complémentaires sur ce sujet sont nécessaires pour déterminer le meilleur moment pour récolter *T. garganica* afin d'optimiser l'extraction de Tg, considérant que le composé reste extrêmement coûteux à 187 € par mg (Sigma-Aldrich).

Tableau 8 : Analyse factorielle bidirectionnelle de la variance sur l'effet de l'irradiation (irradiation gamma), méthode d'extraction et localité sur la variation chimique des extraits de *T. garganica* avec signification affichée comme *** P> 0,00, ** P>0,001, *P>0,01. df=degrés de liberté, Somme sq = somme des carrés, Moy sq = moyenne quadratique, F_s=F statistique.

Résultats de l'analyse ANOVA										
Source de la variation	Racines					Feuilles				
	df	Somme sq	Moy sq	F _s	Pr(>F)	df	Somme sq	Moy sq	F _s	Pr(>F)
γ-irradiation	7	5.73	0.82	0.78	0.61	7	0.30	0.04	0.55	0.80
Méthode d'Extraction	2	15.21	7.60	7.21	0.0011 **	2	0.70	0.35	4.47	0.014 *
Localité	1	9.67	9.67	9.17	0.0031 **	1	0.01	0.01	0.10	0.75
Extraction:Localité	2	1.21	0.60	0.57	0.57	2	0.15	0.08	0.96	0.39
γ-irradiation:Extraction	14	9.57	0.68	0.65	0.82	14	0.37	0.02	0.34	0.99
γ-irradiation:Localité	7	2.94	0.42	0.40	0.90	7	0.21	0.03	0.39	0.91

II.2.1.4. Conclusion

En général, la fluctuation des teneurs en Tg, Tc et Nb ne peut être liée à l'irradiation, mais plutôt à la procédure d'extraction (**Tableau 7 et 8**).

Ces résultats montrent que la méthode d'extraction et l'aire de croissance des échantillons influent de manière significative sur la teneur en thapsigargins dans nos échantillons par rapport à l'effet de l'irradiation gamma, où les pourcentages sont plus stables.

Nous avons conclu que des doses d'irradiation de 0,1 à 10 KGy n'avaient aucun effet significatif sur les trois teneurs de thapsigargins, ces résultats concordent avec ceux obtenus par **Silva et al., (2008)**. Dans cette optique, nous avons estimé la stabilité des composants actifs de *Thapsia garganica*, après traitement par les rayonnements gamma ; et que la Nortrilobolide était trop radiosensible et que son montant était négligeable par rapport aux teneurs en Tg et en Tc. La teneur en thapsigargins dépend de plusieurs paramètres, zone de récolte, conditions de stockage, mode de broyage et processus d'extraction. En effet, des travaux antérieurs ont montré une variation significative de la composition dans Tg selon la superficie de culture et la technique d'extraction (**Ollivier et al., 2013**).

III. Evaluation des résultats de l'activité antioxydante des plantes

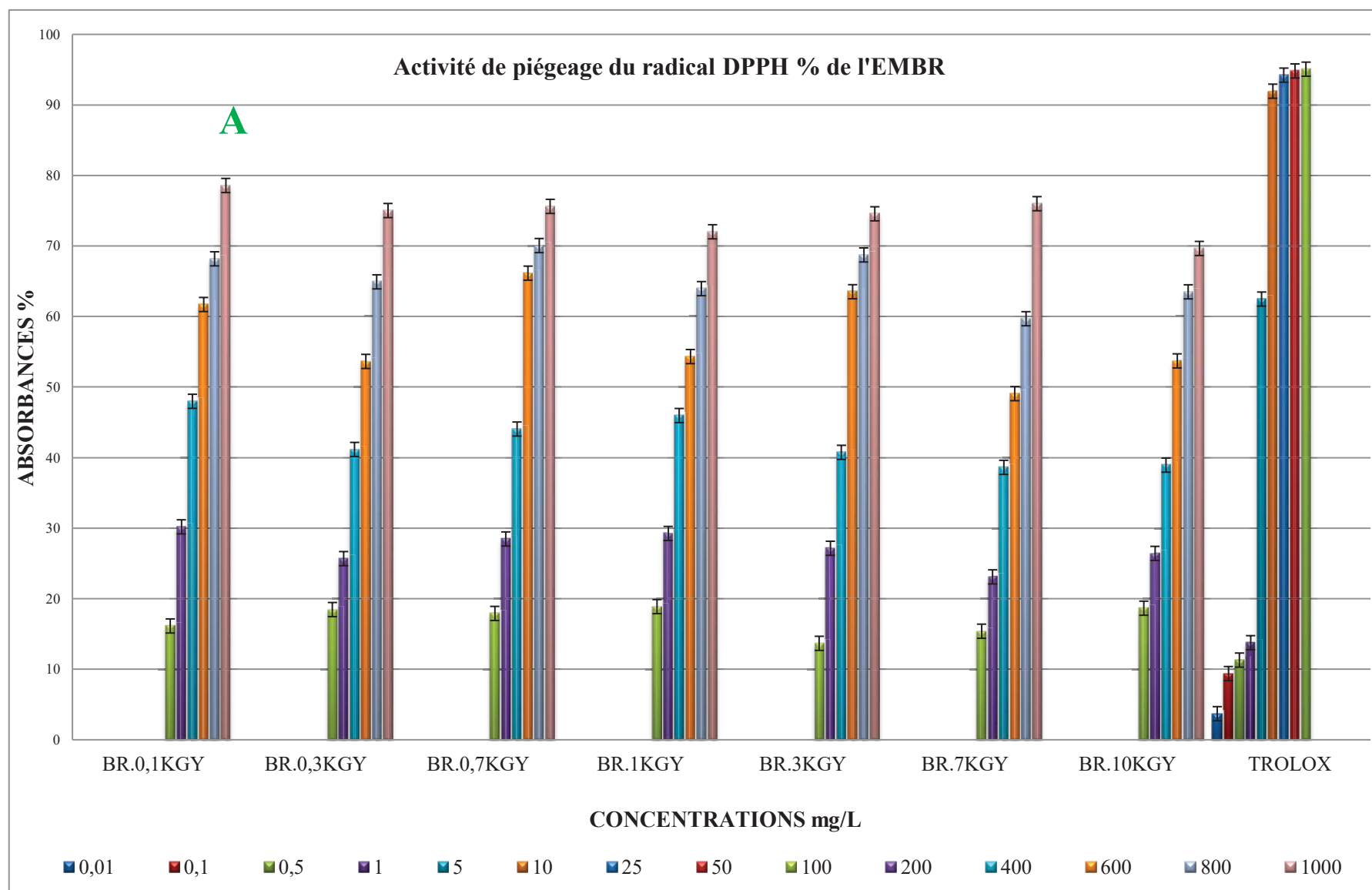
Les résultats d'une méthode ne donnent que des suggestions réduites sur les propriétés antioxydantes des extraits. Pour une évaluation efficace et complète des potentiels antioxydants chez une ou plusieurs espèces, une combinaison de plusieurs techniques complémentaires, associant des mécanismes différents serait idéale. Deux méthodes sont employées dans notre étude : piégeage du radical libre DPPH et le test ABTS.

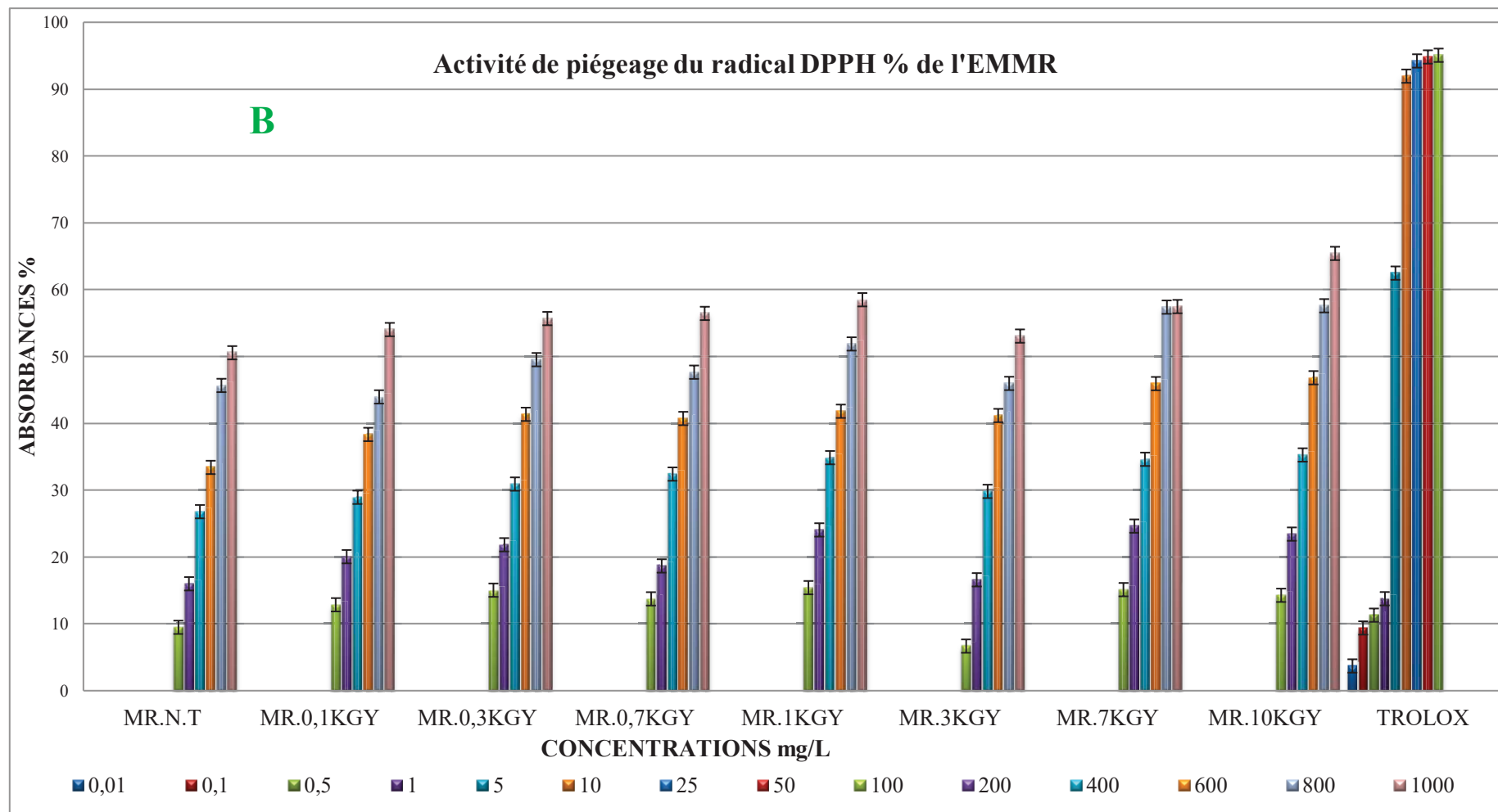
III.1. Evaluation de l'activité de piégeage du radical DPPH %

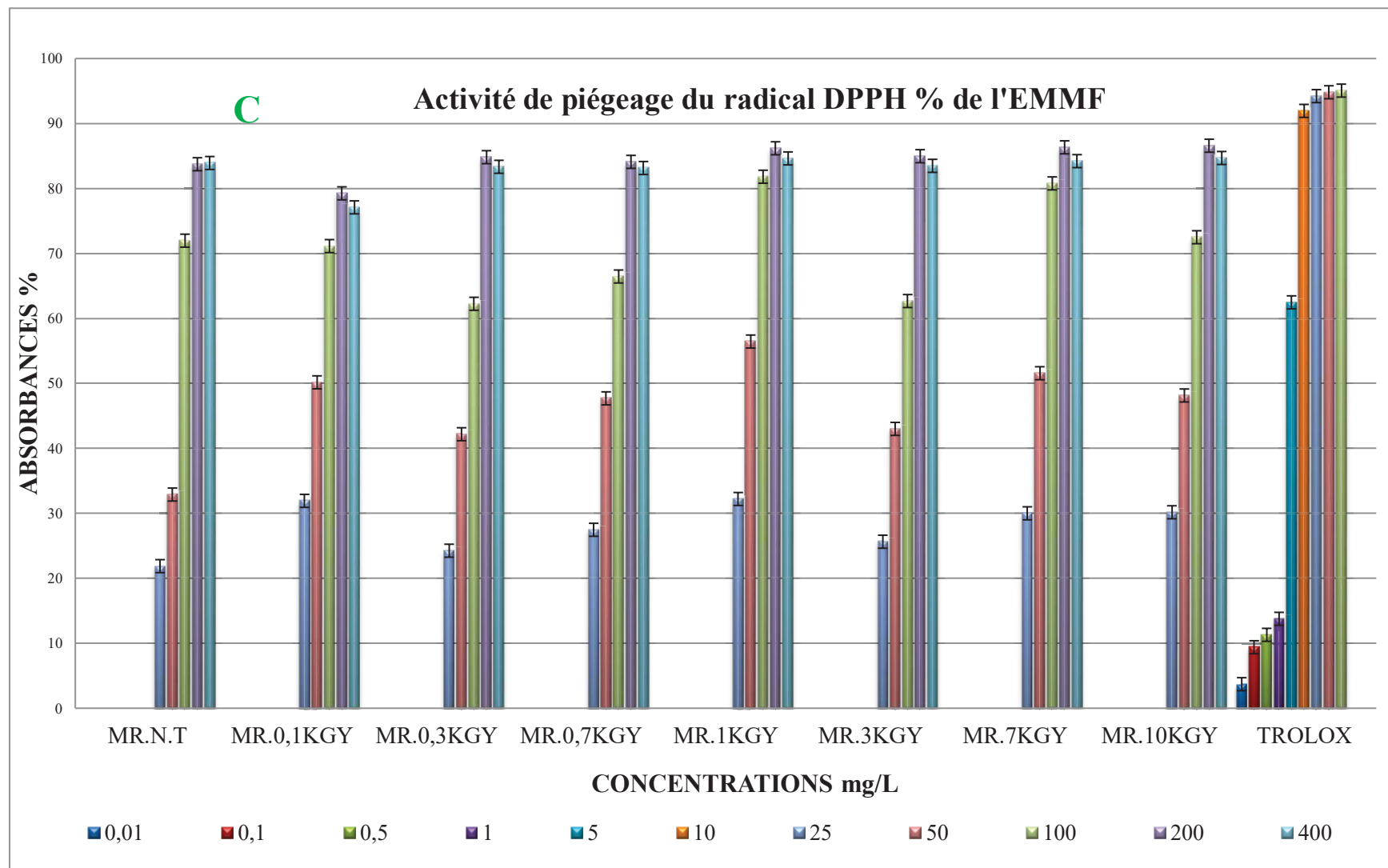
L'activité antioxydante exercée sur le radical libre DPPH par les extraits Méthanoliques (E.M) est dépendante de doses.

Les résultats de cette activité sont exprimés par le paramètre IC50 et figurent dans le tableau 6. L'extrait (ou fraction) possédant la valeur IC50 la plus basse, exerce l'activité anti-radicalaire la plus puissante. Les résultats de ce test sont hautement reproductibles et comparables à d'autres méthodes de piégeage des radicaux libres tel que l'ABTS ou 2,2 azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate).

Les résultats de l'évaluation de l'activité de piégeage du radical DPPH par les extraits méthanoliques et le TROLOX sont résumés dans la **figure 37**, montrant et pour chaque région et partie de plante, l'influence de l'irradiation sur l'activité antiradicalaire des extraits de la plante par rapport au témoin non irradié et au standard Trolox.







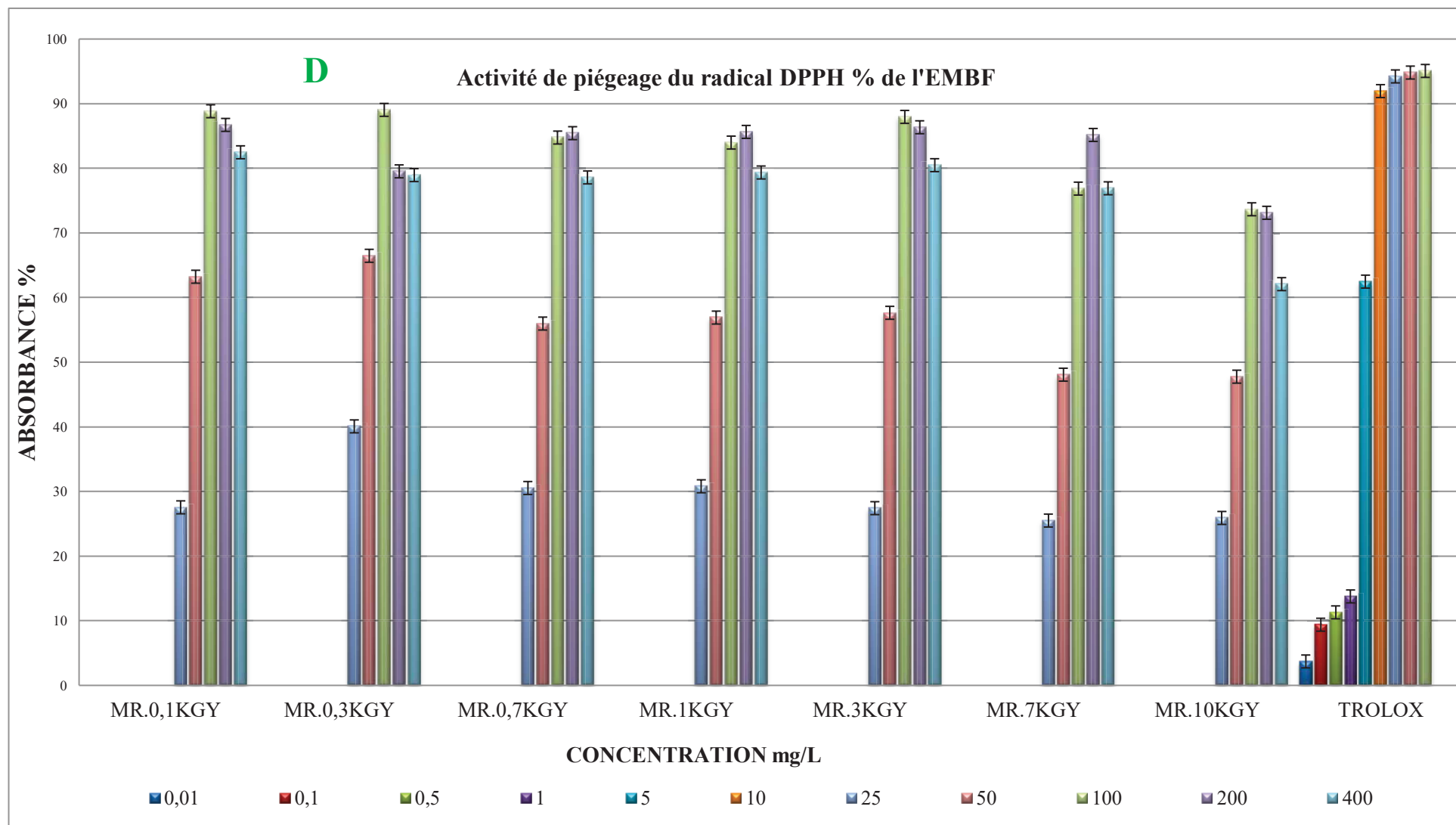


Figure 37 : Historgrammes récapitulant l'activité de piègeage du radical DPPH (%) des différentes parties de plante des deux régions selon les fréquences d'irradiation gamma, **A** : de l'extrait méthanolique des racines de Béjaia (EMBR) ; **B** : de l'extrait méthanolique des racines de Médéa (EMMR) ; **C** : de l'extrait méthanolique des feuilles de Médéa (EMMF) ; **D** : de l'extrait méthanolique des feuilles de Béjaia (EMBF).

Il apparait clairement que les extraits de *T.garganica* présentent une capacité de réduction du radical DPPH relativement élevée ; et que les feuilles présentent un pouvoir nettement supérieure par rapport aux racines, et peut atteindre 90% de réduction pour des concentrations supérieures ou égales à 100 mg/l par contre une bonne activité de ces dernières n'est remarquable qu'au-delà de 600 mg/l.

On remarque qu'à de très faibles concentrations du **TROLOX** l'activité de piégeage du radical DPPH est nettement supérieure à celle des E.M et qu'à la faible concentration des E.M (100mg/l) utilisée, le **TROLOX** a un pouvoir de $95,06 \pm 0,03$.

Au-delà du seuil de concentration (100 mg/l) l'activité de tous nos E.M des feuilles atteint les 50% du piégeage du DPPH, ce qui confirme leur bonne activité.

On remarque que l'activité antiradicalaire est relativement stable en fonction des doses d'irradiation gamma, ce qui confirme la fiabilité de ce traitement en tant que procès de conservation des herbes.

Les résultats obtenus exprimés en terme de concentration inhibitrice de 50% des radicaux (IC50) (**Tableau 10**) montrent que cette dernière varie dans l'intervalle 600– 990 mg/L pour les E.M.R de Béjaia et 379-600mg/l pour les E.M.R de Médéa, selon les fréquences d'irradiation gamma. Cette activité est nettement plus importante pour les E.M.F dont elle varie entre 44 à 70% (Médéa) et 36 à 52% (Béjaia). On remarque ainsi une très légère influence de l'irradiation sur l'activité de piégeage de DPPH ; par contre les échantillons de Béjaia restent plus actifs que ceux de Médéa d'où l'influence de l'endroit et de la zone de l'échantillonnage et des conditions géographiques sur l'activité antioxydante, ainsi que les parties de plantes traitées, dont les feuilles de *T.garganica* ont fourni un pouvoir plus important en termes de réduction du radical DPPH.

L'antioxydant synthétique TROLOX a manifesté la plus petite aptitude à réduire le DPPH ($IC_{50} \mu g/ml = 1,93 \pm 0,19$). Il est très difficile de trouver une relation claire et nette entre la composition chimique et particulièrement entre les teneurs des principaux composés et le pouvoir de piégeage du radical DPPH.

On estime aussi que cette activité est probablement liée à la teneur en composés phénoliques contenus dans nos échantillons (**Tableau 9**), dont **Djeridane et al. (2010)** ont trouvé que cette dernière est faible et ont confirmé ainsi que la teneur en phénols des extraits n'a pas de corrélation significative avec leur activité antiradicalaire mesurée par le dosage DPPH ($R^2 < 0,1$). En outre, la quantité de flavonoïdes dans les extraits de plantes analysés ne présentait qu'une faible corrélation avec la quantité totale de phénoliques.

Tableau 9 : Comparaison de résultats de l'activité antioxydante (DPPH) de *T.garganica* avec d'autres études ultérieures

Nom de la plante	Partie traitée	Teneur en phénols totaux ^a	Teneur en flavonoïdes ^b	Activité de piégeage du radical libre (DPPH)	
				IC50 µg/ml	
<i>Thapsia garganica</i>	Aérienne	01,84	01,25	17,06 ± 0,02	Djeridane et al., (2010)
	Feuilles	47,64	18,13	90,72±0,98	Rached et al., (2010)
	Ecorces	95,88	23,98	78,52±1,15	
	Fleurs			73,2% (200mg/l)	Chibani et al., (2014)
	Feuilles			68.7% (200mg/l)	
	Feuilles Médéa	-	-	70±2,63	Echantillons de l'étude
	Feuille Béjaia	-	-	36±0,38	
	Racines Médéa	-	-	990±13,31	
	Racines Béjaia	-	-	379±10,40	

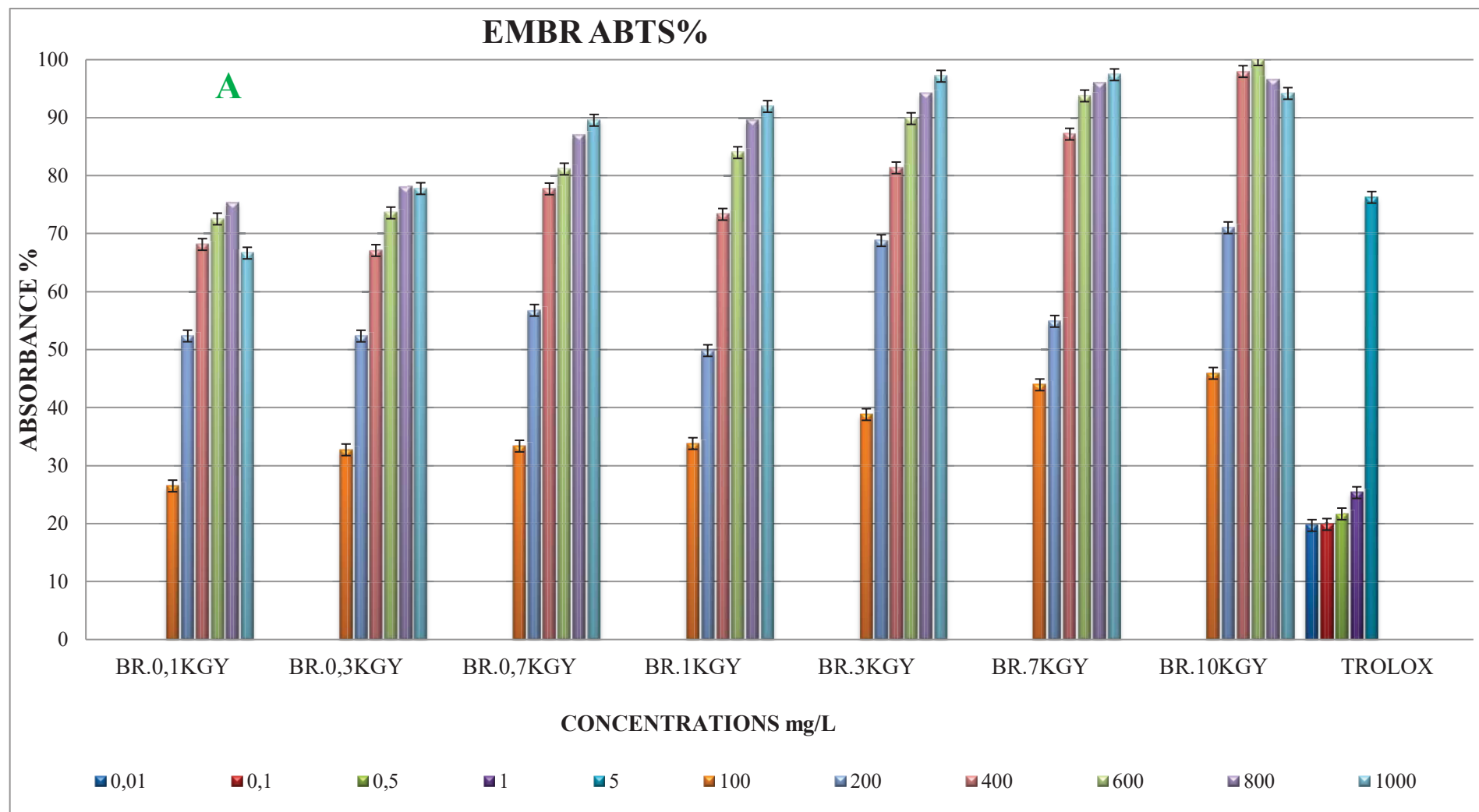
a : Valeurs exprimées en mg GAE/g dw. **b :** Valeurs exprimées en mg RE/g dw.

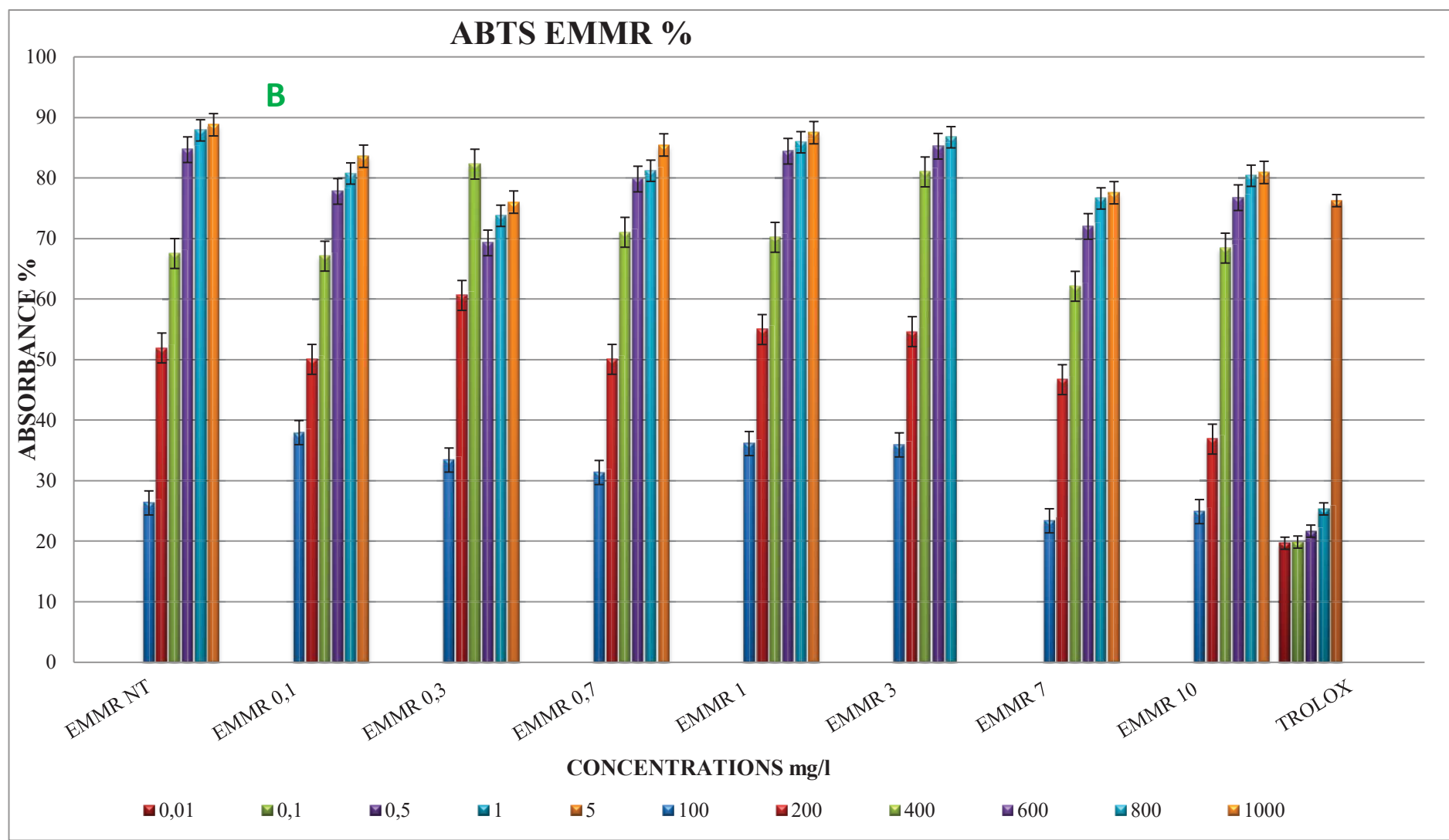
Notre étude montre clairement que l'activité de piégeage du radical DPPH des feuilles de *T.garganica* originaire des Béjaia et Médéa est plus forte que celle trouvée par **Rached et al.,(2010)** avec un IC50= 90.72±0.98 <70µg/ml (Médéa) <36µg/ml (Béjaia). Tandis que, la partie aérienne de la plante traitée par **Djeridane et al. (2010)** fourni une meilleure activité par rapport à nos échantillons et aux autres travaux cités dans le **tableau 9**. Comme le montre le **tableau 9**, les E.M de fleurs et les E.M de feuilles de l'étude de **Chibani et al.,(2014)** ont sensiblement agit sur le radical DPPH de respectivement 73,2% et 68,7% à une concentration de 200 mg/l. A cette concentration l'activité antioxydante de nos E.M.F est nettement supérieure et atteint 84% (E.M.B.F) et 81,27% (E.M.B.F) (**Fig.37**).

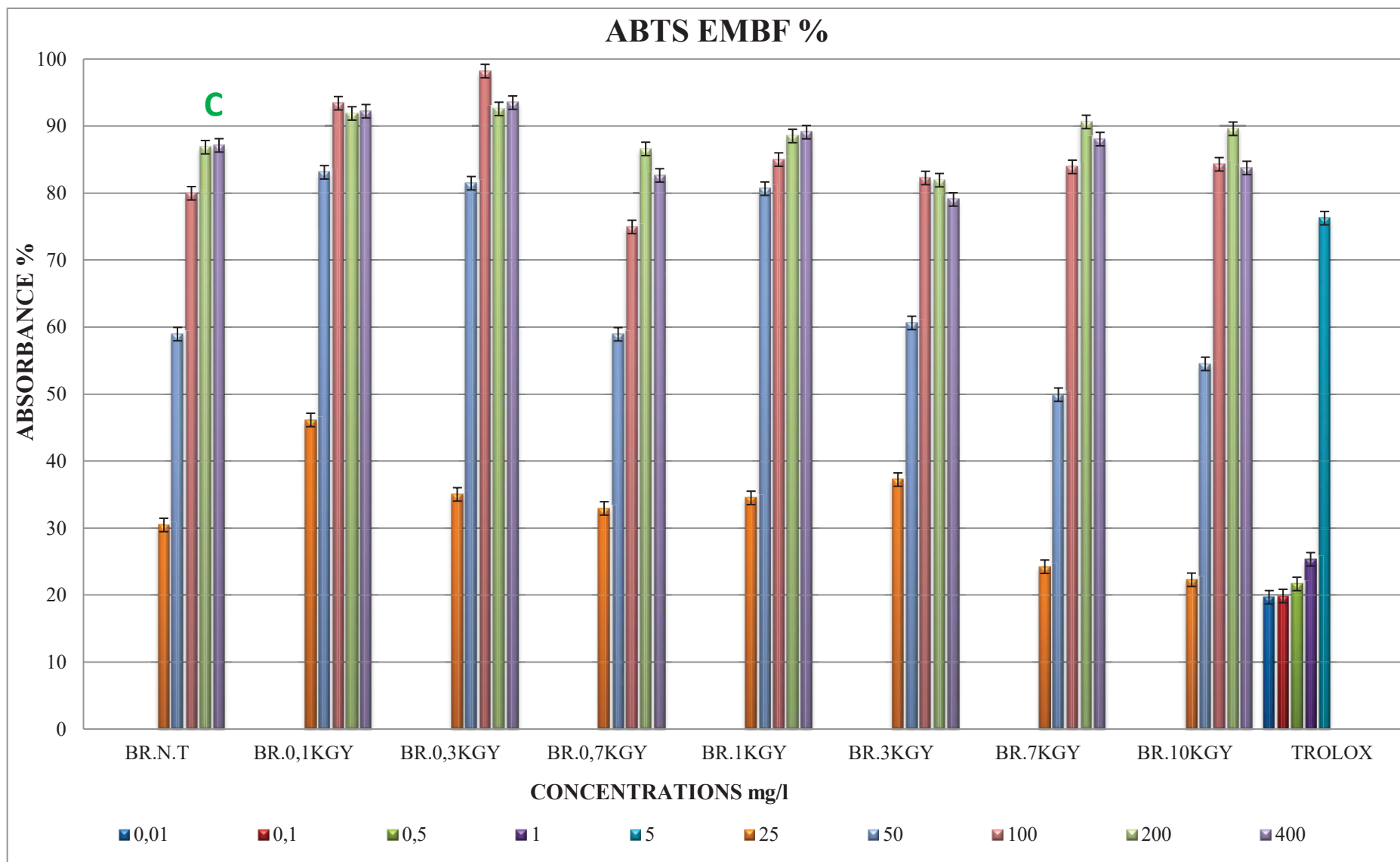
En comparant l'activité antiradicalaire fournie par les E.M.R, les E.M.B.R ont un pouvoir plus important que celui fourni par E.M.M.R (**Tableau 9**), cette activité paraît très faible par rapport à celle trouvée dans les extraits de l'écorce de *T.garganica* par **Rached et al.,(2010)** 78.52µg/ml.

A partir de ces résultats, nous pouvons conclure que les feuilles et les fleurs de *Thapsia garganica* possèdent une activité antioxydante équivalente élevée. Le rôle principal des composés comme réducteurs des radicaux libres est souligné dans plusieurs rapports (**Villaño et al., 2007**).Ce n'est pas uniquement les composés majoritaires des HE ou extraits qui sont responsables de cette activité antioxydante, mais il peut y avoir aussi d'autres composés minoritaires qui peuvent interagir d'une façon synergique ou antagoniste pour créer un système efficace vis-à-vis des radicaux libres (**Lu et Foo, 2001, Singh et al., 2007**).

III.2. Evaluation de l'activité réduction du radical cation d'ABTS %







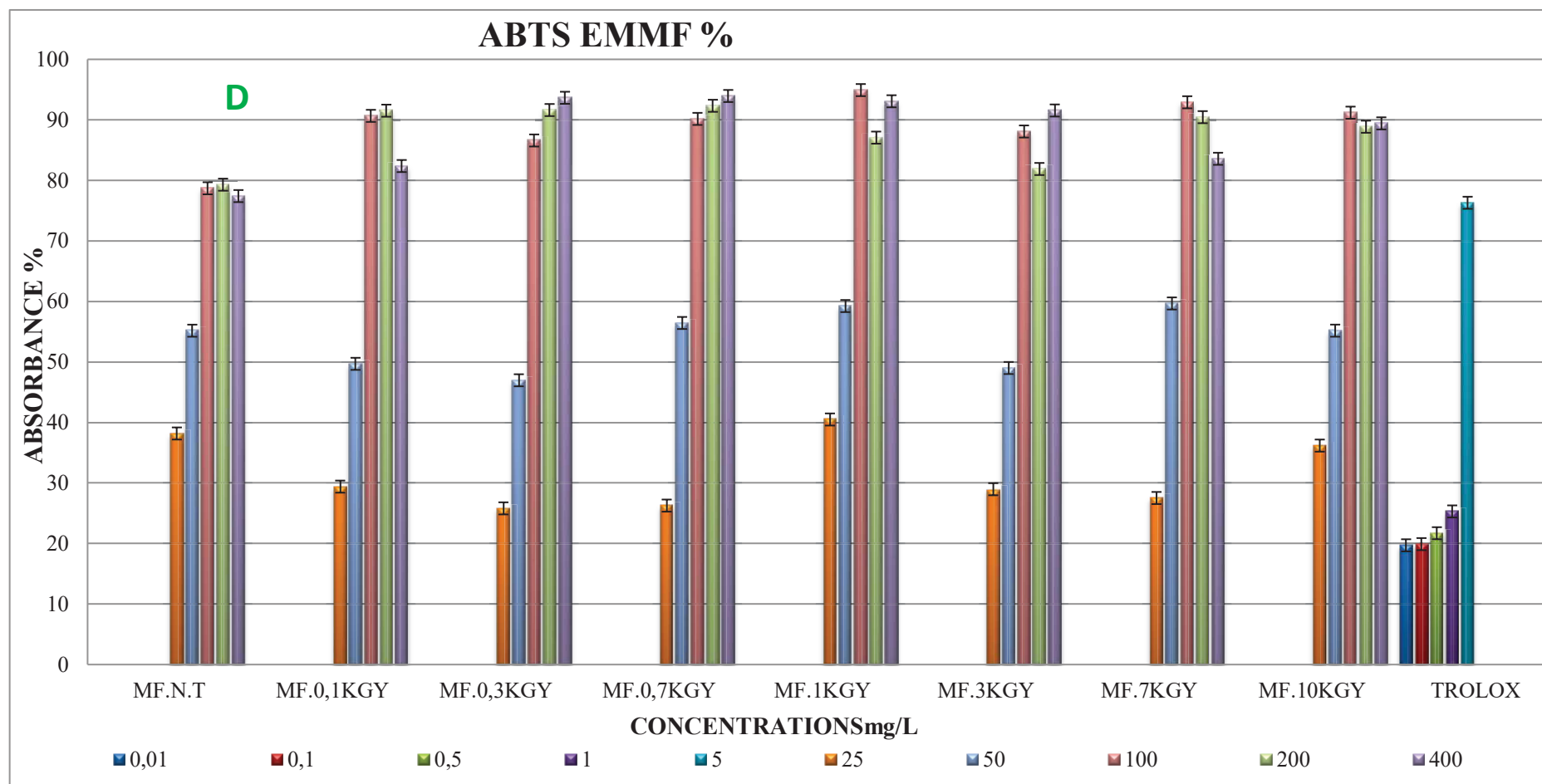


Figure 38 : Histogrammes récapitulant l'activité de réaction du cation ABTS (%) des différentes parties de plante des deux régions selon les fréquences d'irradiation gamma. **A :** de l'extrait méthanolique des racines de Béjaia (EMBR) ; **B :** de l'extrait méthanolique des racines de Médéa (EMMR) ; **C :** de l'extrait méthanolique des feuilles de Béjaia (EMBF) ; **D :** de l'extrait méthanolique des feuilles de Médéa (EMMF).

Après une absorbance de $1 \pm 0,02$ au spectrophotomètre de la solution d'ABTS⁺, la diminution de l'absorbance sera mesurée à 734nm.

L'activité antiradicalaire des échantillons testés pour les différentes régions et parties de la plante, est exprimée en pourcentage d'inhibition de l'ABTS⁺ est mentionnée à la **figure 38**, illustrant un pouvoir important des E.M de la plante.

Les résultats montrent une bonne activité inhibitrice l'ABTS⁺, en comparant l'activité des échantillons, il paraît que les extraits de plantes sont plus actifs à de faibles concentrations au-delà de **100mg/L (feuilles)** et **400mg/l (racines)** pour atteindre presque la totalité (100%) de réduction des radicaux ABTS.

Or que pour tous les échantillons de feuilles la concentration inférieure à 50 mg/l a permis d'atteindre 50% de réduction (**Tableau 10**), dont les IC₅₀ sont de l'ordre de 43 à 53 mg/l (E.M.R.M) et de 23 à 55 mg/l (E.M.R.B) ; et entre 110 à 200 mg/l (E.M.F.B) et 169 à 231 mg/l (E.M.F.M) ; ces résultats confirment en second lieu l'efficacité des feuilles de *T.garganica* comme antioxydant et à réduire le cation ABTS ; De plus, les échantillons prélevés de Béjaia semblent plus dotés de pouvoir antioxydant et que quelle que soit la dose de traitement par rayons gamma, cette activité est stable en gardant le même pouvoir. Reste le TROLOX qui possède une meilleure activité inhibitrice à des concentrations très infimes où l'IC₅₀ se situe même à 2,8 mg/L.

IV. Etude des interactions entre les substances actives, leurs activités biologiques selon les traitements et les paramètres fixés de l'étude

IV.1. Effet de l'irradiation gamma sur les propriétés antioxydantes de *T.garganica*

L'irradiation gamma n'a pas eu d'effet significatif sur l'activité antioxydante des extraits des racines de *T.garganica* (**Tableau 10**). Cependant, une différence significative est constatée entre les activités de piégeage des extraits de feuilles et de racines entre les régions de Médéa et Béjaia.

Les valeurs sont comme suit : pour les tests ABTS⁺⁺ [feuilles (valeur F=4,97, valeur P=0,05), racines (F-valeur = 8,68, P-valeur = 0,01)] et les tests DPPH [feuilles (valeur F= 9,66, valeur-P=0,01), racines (valeur F=59,77, valeur P=0,00)]. On a noté que les valeurs de IC₅₀ pour le dosage de DPPH étaient plus élevées que celles obtenues avec le dosage ABTS⁺⁺ pour les extraits de racines (**Tableau 10**). Ceci est probablement dû au contenu plus élevé de ces composés dans les extraits des racines. On a déjà montré que les tests DPPH constituent un test rapide et fiable pour la capacité antioxydante des extraits de plantes, mais aussi un dosage

avantageux applicable aux environnements hydrophiles et lipophiles. Les extraits de feuilles ont une activité de balayage beaucoup plus élevée que les extraits de racines avec ceux de la région de Béjaia généralement plus élevés que ceux de Médéa. Cela montre à nouveau qu'il existe des facteurs biologiques ou environnementaux responsables de ces fluctuations. Comme *T. garganica*, d'autres plantes médicinales algériennes ont été proposés comme sources potentielles d'antioxydants naturels (Djeridane *et al.*, 2006). La conservation de la plante est nécessaire et un tel procédé d'irradiation a prouvé son efficacité de garder une stabilité du pouvoir antioxydant de *T. garganica*.

Tableau 10 : Activité antioxydante des extraits méthanoliques de *T.garganica* obtenus par MC après irradiation gamma à différentes doses.

KGy	DPPH IC ₅₀ (mg/L)				ABTS IC ₅₀ (mg/L)			
	MR	MF	BR	BF	MR	MF	BR	BF
0	990±13,31	70±2,63	379±10,40	36±0,38	198±6,06	50±0,10	200±10,79	40±1,29
0.1	926±0,91	50±0,68	413±3,26	40±0,51	198±0,51	53±0,88	180±1,06	23±3,98
0.3	808±1,72	59±0,91	559±4,90	38±1,40	169±0,13	52±0,17	196±7,89	28±6,36
0.7	790±0,10	52±1,11	450±1,23	45±2,50	199±0,02	49±3,47	176±0,83	49±5,29
1	789±6,03	44±0,55	518±10,80	44±0,19	188±3,57	48±3,64	200±9,55	44±0,78
3	993±1,01	58±0,83	491±11,90	47±0,85	194±9,05	50±1,50	150±8,05	44±0,24
7	722±14,26	48±0,19	611±3,74	52±0,72	214±8,98	43±1,39	182±2,40	55±1,55
10	600±21,13	51±1,53	559±12,48	52±1,79	231±9,84	46±0,90	110±4,92	47±0,94

Les valeurs sont présentées comme moyenne des IC₅₀ (mg/L) (la dose permettant de causer 50% inhibition du radical) de triplicata ± écart-type au niveau de signification de 5%. DPPH= 2,2-diphenyl-picryl-hydrazyl assay, ABTS=2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt assay. Le dosage d'irradiation gamma (D) est donné en KGy. MR=Médéa racines, MF=Médéa feuilles, BR=Béjaia racines, BF=Béjaia feuilles.

Le tableau 10 montre l'effet d'irradiation gamma sur l'activité antioxydante des échantillons méthanoliques obtenus par MC et selon ces résultats, on déduit que tous les extraits et les fractions sont dotés d'une activité antioxydante, qui varie d'un extrait à un autre et d'une fraction à une autre pour différents ou même échantillon végétal.

IV.2. Effet simultané de l'extraction des micro-ondes et des doses d'irradiation gamma sur la capacité antioxydante de *T.garganica*

Il est à noter que les concentrations de l'IC₅₀ du test ABTS sont plus importantes par rapport à celles du test DPPH (**Fig.38**). Cela révèle l'efficacité de cette méthode, prouvée précédemment que celle-ci n'était pas seulement un test rapide et fiable de la capacité antioxydante totale, mais aussi un dosage avantageux applicable à la fois aux systèmes antioxydants hydrophile et lipophile. Cette technique a visiblement augmenté la capacité antioxydante des extraits de racines par essai DPPH de IC₅₀=990±0,02 mg/l à IC₅₀=198±0,02mg/l (essai ABTS) pour les racines de Médea et de IC₅₀ (DPPH)=379±0,02 mg/l à IC₅₀ (ABTS) = 200 ± 0,02 mg/l pour les racines de Béjaïa.

Cette différence n'est pas significative pour les extraits de feuilles des régions étudiées. En revanche, le plus haut niveau d'activité de balayage a été mesuré dans des extraits méthanoliques de feuilles de *T.garganica* ; Les activités de réduction du DPPH étaient (IC₅₀, 70 mg/l) et (IC₅₀, 40 mg/l); Les activités ABTS (IC₅₀) étaient de 50 et 36 mg/l pour les extraits de feuilles Médea et Béjaïa respectivement. Bien que la valeur de 200 g/mL a été obtenue pour l'activité antioxydante par les fleurs et les feuilles de *Thapsia garganica* (73,2% et 68,7%) respectivement **Chibani et al. (2014)**. Alors que l'activité de balayage DPPH la plus forte a été observée en corrélation avec les solvants d'extraction par **Athmouni et al. (2015)** avec une valeur IC₅₀ de 0,16 ± 0,02 pour l'acétate d'éthyle et l'extrait de méthanol avec 0,24 ± 0,04 mg/ml d'extrait, tandis que les résultats avec l'essai ABTS étaient de 1,41 ± 0,32 Mm TE/g MS et 1,32 ± 0,07 Mm TE/g MS pour les solvants de remorquage respectivement.

Les extraits d'hexane et d'eau des feuilles de *T.garganica* ont la plus faible capacité de balayage des radicaux DPPH, avec une IC₅₀ de 0,27 ± 0,06 et de 0,36 ± 0,01 mg/ml d'extrait respectivement. Cela peut être dû à une différence quantitative et qualitative du profilé phénolique relative à chaque partie de la plante.

L'effet du rayonnement gamma et des micro-ondes est révélé en favorisant parfois l'activité de balayage des radicaux libres et c'est le cas de la plante de Médea pour le test DPPH dont l'IC₅₀ a progressivement diminué pour atteindre 600 mg/l à D₁₀, le cas est visible pour la dose D₅ (IC₅₀=993 mg/l); Au moment où l'examen ABTS a enregistré une meilleure activité antioxydante à faible dose d'irradiation (IC₅₀=169 mg/l, D₂). Ensuite, il s'est dégradé en fonction de la dose appliquée (jusqu'à 231 mg/l à D₇).

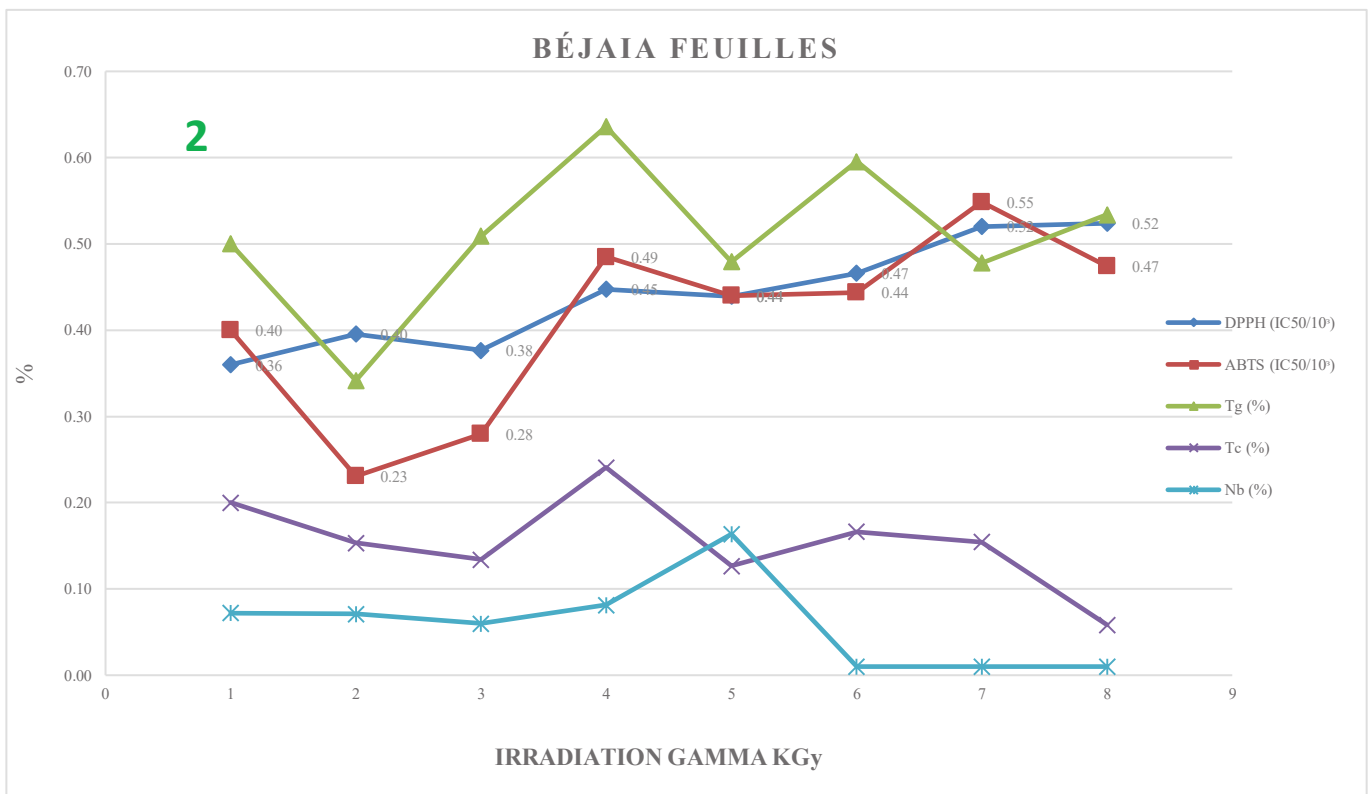
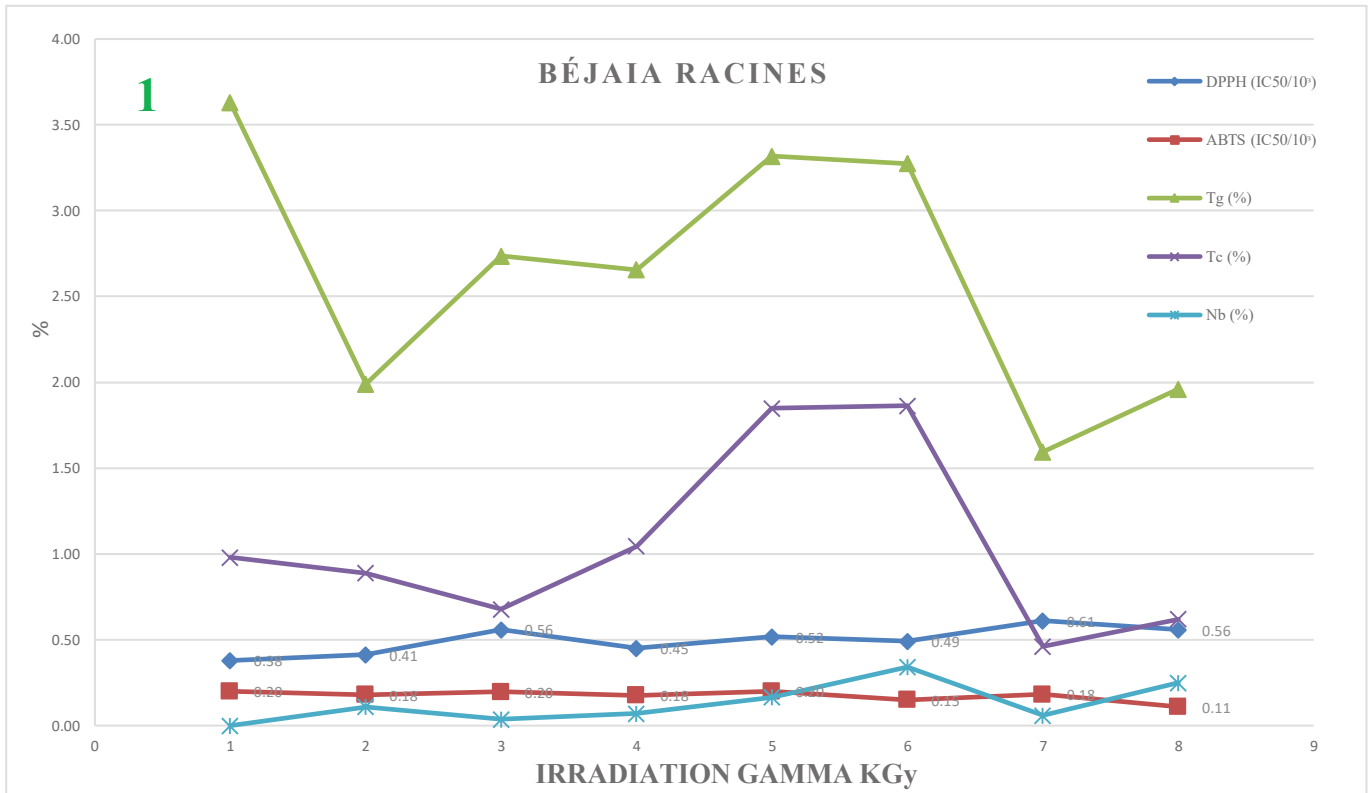
De légères fluctuations ont été observées dans les extraits de racines de Béjaia par les deux tests, pratiquement avec un profil similaire comprenant les doses D₁, D₃, D₅ et D₇ qui ont fourni une bonne activité contre D₂, D₄, D₆. Les IC₅₀ changent de (413, 450, 491 et 559 mg/l) à (599, 518, 611mg/l) et de (180, 176, 150 et 110mg/l) à (196, 200, 182 mg/l) respectivement pour les tests DPPH et ABTS. (Fig.39)

L'activité antioxydante des extraits de feuilles de la plante de Médéa a été importante, mais elle s'est dégradée avec des doses croissantes d'irradiation gamma où l'IC₅₀ (DPPH) variait légèrement et progressivement, passant de D₁ (40 mg/l) à D₁₀ (52 mg/l). Cependant, une influence notable est apparue pour les doses D₁ et D₂, ce qui a amélioré la capacité à réduire le radical ABTS (IC₅₀ de 23 mg/l et de 28 mg/l chacun). L'activité antioxydante de *T.garganica* provenant des extraits de feuilles de Médéa était moins influencée par l'irradiation gamma. En effet, aucune variation significative de la valeur IC₅₀ n'a été notée par les tests DPPH ou ABTS, tout en conservant la même tendance et le même profil (Fig.39).

Les résultats sont différents de ceux trouvés dans la littérature, la capacité de balayage de DPPH des extraits de méthanol de *T.garganica*, étudiée par Tlili *et al.*, 2015 était de $45,8 \pm 0,01$ (IC₅₀ $\mu\text{g ml}^{-1}$) et $39 \pm 0,04$ (IC₅₀, $\mu\text{g ml}^{-1}$) pour réduire la puissance.

Ces résultats montrent clairement peu d'influence du protocole de traitement gamma et de méthode d'extraction des composés bioactifs de *T.garganica* mais une importante influence surtout de la région de collecte de la plante, la différence de la capacité antioxydante ainsi peut être due à la teneur en polyphénols dans la plante. La nature et la concentration des composés phénoliques dans les plantes qui sont même très sensibles aux conditions climatiques et environnementales (Chalker-Scott et Fuchigami, 1989 ; Waterman et Mole, 1994) et une isolation géographique peuvent contribuer à augmenter la différenciation génétique parmi plusieurs entités taxonomiques (Jay et Lumaret, 1995). Les composés phénoliques totaux de $24,65 \pm 1,5$ (mg GAE / g MS), ont été quantifiés dans des graines de *T.garganica* selon Tlili *et al.*, (2015), dont l'huile obtenue de ces graines de thapsia (30%) pourrait servir de source alternative d'huile contenant principalement des acides gras insaturés (environ 90%) ayant une valeur industrielle. Les méthodes utilisées pour l'extraction des composés avaient également un effet important sur l'activité antioxydante.

IV.3. Effet simultané de l'extraction micro-onde et l'irradiation gamma sur la capacité antioxydante de *T.garganica* et le taux en Tg, Tc et Nb



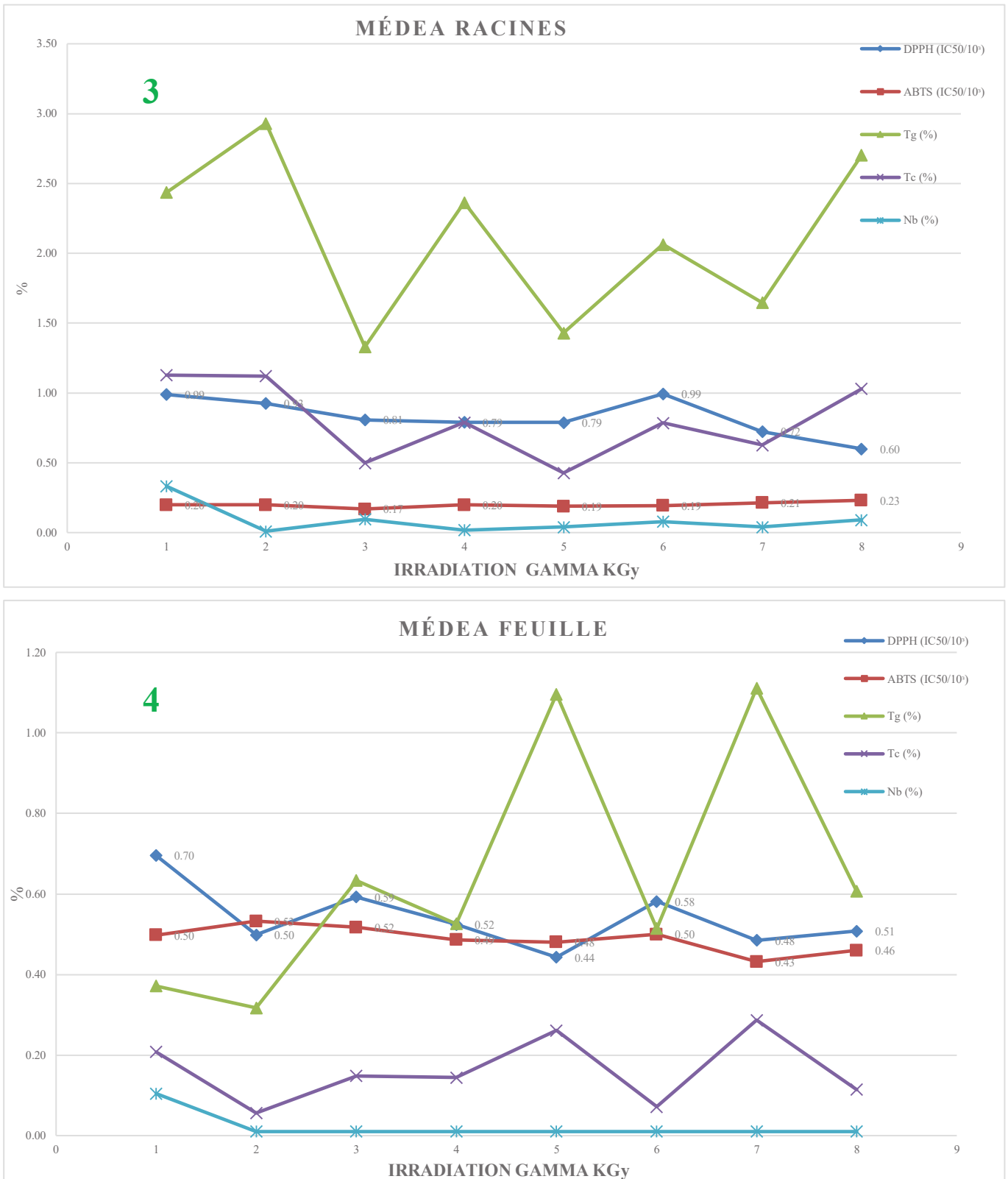


Figure 39 : Corrélation entre le taux de *T.garganica* en Tg, Tc et Nb et son activité antioxydante à différentes fréquences d'irradiation.

1 : de l'extrait méthanolique des racines de Béjaia ; 2 : de l'extrait méthanolique des feuilles de Béjaia ; 3 : de l'extrait méthanolique des racines de Médéa ; 4 : de l'extrait méthanolique des feuilles de Médéa.

Ces différences pourraient être attribuables aux variations dans la capacité des composants antioxydants à agir contre les différents radicaux présents ou formés lors de chaque réaction spécifique. Une corrélation claire entre les quantités totales de composés thapsigargins et l'activité antioxydante n'a pas été révélée, sauf que pour les extraits de feuilles de Béjaia où il a été observé que l'activité a diminué et augmenté avec la même manière de fluctuation de la quantité de Tg dans les feuilles selon les doses gamma appliquées. À l'inverse, pour les grandes doses d'irradiation D₆ et D₇, la quantité de Tg influe inversement sur l'activité ABTS, IC₅₀=55mg/l, (Tg = 0.48%) à IC₅₀ = 47, (Tg = 0.53%) respectivement. Alors que la quantité de Tc diminue de 0,15% (D₆) à 0,06% (D₇) et que la quantité de Nb a tendance à disparaître pour atteindre 0%, l'activité DPPH marque une régression par rayonnement de dose et indépendamment des concentrations des thapsigargins.

Pour les autres échantillons (racines de Médea et Béjaia et feuilles de Médea), les deux tests ont montré une activité plus ou moins stable basée sur des doses de traitement. De plus, les profils de fluctuation des niveaux de Tg et Tc par rapport au traitement par rayons gamma sont pratiquement similaires (**Fig.39**). Ce qui a permis de dire que le rayonnement gamma agit de la même manière sur le plan chimique des molécules de thapsigargins. En effet, aucune corrélation n'a été observée entre la capacité bioactive dans certaines parties de la plante et son activité antioxydante.

Les extraits de racines de *T.garganica* ont un très faible pouvoir antioxydant malgré leur richesse en thapsigargins. Il est à constater donc l'existence d'autres substances actives responsables d'une telle activité, mais qu'elles n'ont pas été identifiées dans notre étude.

Les résultats observés dans cette étude concordent avec le profil observé des composants volatils de *A. gigas Nakai*, où aucun changement significatif n'a été observé avec l'irradiation, et le contenu des matières volatiles ne diffère pas du contenu des échantillons non irradiés (**Seo et al., 2007**). Aussi, avec la même observation en quantité de paeoniflorine dans *Paeoniae radix* (**Yu et al., 2004**). Il a été démontré plutôt que la teneur en substances biologiquement actives : les huiles essentielles, les flavonoïdes, les anthocyanines, les glycosides et les mucus des plantes ne changeaient pas de façon significative après l'irradiation gamma.

Owczarczyk et al., 2000, contrairement à **Variyar et al., 1997** ; **Gyawali et al., 2006**, **Yalcin et al., 2011** et **Polovka et Suhaj, 2013**, ont indiqué que la valeur et le contenu volatil des extraits de certaines épices et herbes ont été modifiés par irradiation, également pour la qualité sensorielle (**Kirkin et al., 2014**), tandis que, **Waje et al., (2008)** n'ont pas observé de changement dans les valeurs de couleur Hunter du poivre noir après l'irradiation.

De nombreuses études ont prouvé, il y a 40 ans, l'efficacité de l'irradiation pour contrôler les contaminations fongiques (**Malla *et al.*, 1967, Jemmali et Guilbot, 1970, Applegate et Chipley, 1973, 1974**). Le point de vue actuel est que l'irradiation est la plus sûre et l'une des méthodes les plus fiables pour la préservation des denrées alimentaires et des produits agricoles (**Shah *et al.*, 2014**).

Cependant, il existe de nombreuses inquiétudes quant à sa sécurité en raison de produits radiolytiques réactifs et d'autres effets indésirables (**Sommer et Fortlage, 1966, Grolichova *et al.*, 2004**). Ce traitement par irradiation de produits alimentaires peut améliorer la production de mycotoxines par les champignons restants (**O'Neill *et al.*, 1996**). Et pour cette raison il est nécessaire de respecter certain seuil de fréquences pour assurer leur salubrité.

A titre d'exemple, l'irradiation doit être suffisamment forte (5 à 10 KGy) pour empêcher la production de mycotoxines (**Ferreira-Castro *et al.*, 2007**). En outre, l'équipe de Ferreira-Castro a montré qu'en utilisant une dose faible de 2 KGy, la production de mycotoxines augmente et que 10 KGy ont été nécessaires pour éliminer complètement la mycotoxine pour l'infection par *Fusarium* du maïs. Les doses inférieures à 10 KGy dans le contrôle de la contamination des aliments sont sans danger (**Smith et Pillai, 2004**).

Selon l'Agence internationale de l'énergie atomique (**AIEA, 1982**), la dose de rayonnement létale pour les moisissures se situe dans la plage de 2,5 et 6,0 KGy. Dans la plupart des études, une dose de 1 et 3 KGy peut réduire de façon significative la quantité d'agents pathogènes (**Shah *et al.*, 2014**). Cependant, une dose de 3 et 20K a été nécessaire pour réduire suffisamment la surface microbienne dans les ingrédients alimentaires secs (**Farkas et Mohàcsi-Farkas, 2011**).

Il existe de nombreux facteurs affectant le processus de rayonnement gamma, tels que la concentration initiale de mycotoxines, la dose absorbée et la quantité d'humidité (**Calado *et al.*, 2014**). En règle générale, l'utilisation d'une combinaison de deux méthodes de traitement, telles que la chaleur et le traitement chimique ou la fermentation et la vapeur, réduit AFs plus que chaque méthode respective individuelle seule (**Jalili, 2016**).

Conclusion

Les résultats de cette étude montrent que ces plantes peuvent être utilisées comme une source facilement accessible d'antioxydants naturels soit comme un complément alimentaire possible, soit dans l'industrie pharmaceutique. Cependant, les composants responsables de l'activité antioxydante de ces plantes ne sont actuellement pas suffisamment connus et d'autres travaux devraient être effectués sur leur isolement et leurs identifications.

Plusieurs études ont montré l'existence de plusieurs raisons expliquant les relations ambiguës entre l'activité antioxydante et les composés phénoliques totaux : **(1)** le contenu phénolique total n'a pas inclus tous les antioxydants ; **(2)** la synergie entre les antioxydants dans le mélange a créé l'activité antioxydante, non seulement dépendante de la concentration d'antioxydant, mais aussi de la structure et de l'interaction entre les antioxydants où avec des concentrations similaires de phénoliques totaux une variation de l'activité antioxydante peut avoir lieu (**Djeridane et al. 2010**) ; **(3)** différentes méthodes pour mesurer l'activité antioxydante avec divers mécanismes peuvent conduire à des observations différentes. L'activité antioxydante mesurée d'un échantillon dépend de l'utilisation de radicaux libres ou d'oxydants dans le dosage.

La conservation de la plante est donc nécessaire et un tel procédé d'irradiation a prouvé son efficacité de garder une stabilité du pouvoir antioxydant de *T. garganica* et proposée comme source potentielle d'antioxydants naturels. Il était montré dans cette étude que, bien que l'irradiation gamma puisse être utilisée comme méthode de stérilisation, la localité où une plante est collectée peut affecter son potentiel antioxydant. La capacité antioxydante des extraits méthanoliques de *T.garganica* indique que cette plante (surtout originaire de Béjaia) peut être une source importante de produits naturels à activité chimio-preventive et chimio-therapeutique.

V. Résultats de l'analyse HS-SPME-CG-MS

V.1. Etude de la volatile des feuilles et racines de *T.garganica*

Dans cette étude, les volatiles ont été extraites à partir des racines et feuilles de *T.garganica*, en utilisant la technique SPME et caractérisées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-MS).

Les composants identifiés et leurs teneurs relatives sont donnés dans le **tableau 11**, où ils sont énumérés dans l'ordre de leur temps de rétention KI, en se référant aux KI (x) cités par **Adams, 2007**.

Tableau 11 a : Composition chimiques qualitative et quantitative des volatiles des racines et feuilles de *T.garganica* identifié avec l'analyse HS-SPME en utilisant la fibre PDMS

Classes chimiques	KI x	Echantillons	M.R	B.R	B.F	M.F	M.F	M.F	M.F	M.F	M.F	M.F	M.F	M.F	M.F	M.F	M.F	M.F	M.R	M.R	M.R	M.R	M.R	M.R	M.R				
			85	85	85	85	0,1	0,3	0,7	1	3	7	10	0,1	0,3	0,7	1	3	7	10	0,1	0,3	0,7	1	3	7	10		
			μM	μm	μm	μm	KGy	KGy	KGy	KGy	KGy	KGy	KGy	KGy	KGy	KGy	KGy	KGy	KGy	KGy	KGy	KGy	KGy	KGy	KGy				
Terpénoïdes		Masses (g)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2				
		Composés																											
	812	Norbornène <S-méthylène-2->	5,77	5,52	5,07	5,18	7,85	7,75	8,26	8,94	9,72	4,08	1,52	2,4	4,95	0,3	0,65	1,5	0,22	0,52	0,9	0,2	0,14	0,2	0,05	0,12	0,1		
	927	Tricyclène	0,15	0,25	0,49	0,08																							
	929	Thujène <α->	0,2	0,16	1,67	0,26																							
	932	Pinène <α->				0,1	0,08	0,16	0,06	0,1		0,13	0,06		0,14	0,41	0,27	0,15	0,37	0,26	0,1	0,2	0,11	0,2	0,59	0,45	0,3		
	947	Camphène	2,94	1,63	4,76	1,25	3,15	1,65	0,93	0,22	0,08	0,09	0,53	0,56	0,77	31,9	24,9	18,3	25,6	23,9	19	15	7,71	11	28,9	23,5	15		
	959	Thuja-2,4(10)-diène											0,09	0,02	0,17	0				0,01		0,3	0,27	0,3	0,07	0,11	0,2		
	964	Octell-5-yne <2-méthyl-(3E)->											0,41																
	971	Verbenène	5,38	4,37		4,45	5,63	6,21	5,66	6,52	6,67	3,93	1,77	2,88	5,36	0,84	0,81	2,12	0,61	0,67	2	0,3	0,16	0,2	0,49	0,4	0,3		
	976	Pinane <trans->										0,05	0,02			0,4	0,67		0,3	0,67									
	977	Sabinène			0,71							0,06						2,25											
	984	Pinane <cis->															1,57	0,79	2,12	1,48	0,8	0,7	0,5	0,5	1,44	1,23	0,9		
	993	Myrcène											0,03					21,2	18,5	13,7	17	16,6	14	14	8,35	10	20,4	18,4	13
	1004	Mentha-1(7),8-diène <ρ->															0,08	0,07		0,06	0	0	0,01						
	1020	Terpinène <α->															0,76			0,02									
	1021	Cymène <ρ->															0,66	0,4	0,69	0,56	0,4	0,8	0,61	0,6	1,1	1,03	1,8		
	1029	Limonène														0,15	0,11	0,05	0,13	0,11	0	0,2	0,12	0,1	0,27	0,22	0,1		
	1036	Ocimène «Z»-β->														1,61	1,14	0,02	1,73	0,95		0,3	0,28	0,2	0,38	0,39	0,3		
	1044	Ocimène «E»-β->														10,1	9,08	7,25	14,9	12,9	8,2	22	18,7	18	29	28	22		
	1062	Terpinène <γ->	0,26		1,44											0,13	0,01				0		0	0					
	1082	Pyrazine <2-acetyl-3-méthyl->											0,09				0,01												
	1084	Cyménène <meta->									0,29																		
	1088	Mentha-2,4(8)-diène <ρ->					0,18	0,22	0,17	0,19	0,14	0,17	0,09		0,09	0,01		0,02	0,01	0,01	0	0	0,01	0	0	0	0		
	1098	Pinène oxide <α->	0,09		0,12																								
	1099	Menthatriène <1,3,8-ρ->	1,68	1,34	2,12	1,43	0,33	0,2	0,25	0,28	0,3	0,12	0,14		0,6	0,09	0,08	0,19	0,1	0,09	0,2	0	0,01	0	0,02	0,01	0		
	1112	Silphinène					0,05	0,07	0,05	0,07	0,19	0,12	0,03	0,02				0,09											
	1345	Longipinène <β->							0,06							0,24	0,35	0,34	0,24	0,25	0,4	3,5	0,46	4,1	1,19	1,92	3,4		
	1353	Silphiperfol-4,7(14)-diène						0,06		0,08		0,1	0,04	0,02	0,04								4,35						
	1362	Longifolène <iso->							0,07			0,03		0,02															
	1391	Cyperène									0,06	0,01										0							

1404	Longipinène <β->					0,21	0,25	0,12							11,6	17,4	24,4	13,8	16,2	20	17	19,4	18	5,84	9,44	15
1412	Funèbrène<2-epi-β->					0,11	0,11	0,11	0,17	0,13	0,22	0,15	0,07	0,04	0,92	1,31	1,77	1,44	1,3	1,6	2,3	3,29	2,9	0,88	1,46	2,6
1417	Caryophyllène<(E)->					0,04	0,11															0,03				
1442	Aromadendrène					0,44	0,37	0,21									0,16				0		0			
1454	Muurola-3,5-diène <trans->					1,98	1,8	1,23	0,1	0,07					1,27	2,01	2,08	3,28	1,31	1,6	7,1	9,82	8,9	2,26	3,81	7
1461	Cadina-H6),4-diène<cîs->							0,06							0,07	0,1	0,21	0,09	0,08	0,1	0,5	0,66	0,6	0,16	0,27	1,3
1472	Gurjunène <γ-> Chamigrène <β->	0,31		0,1	0,35																					
1473	Dauca-5-8- diène					1,85	1,61	1,22	0,18	0,06	0,15	0,03	0,04	0,06		0,1	0,15	0,08		0,1	0,8	0,7	0,7	0,21	0,34	0,5
1480	cucumène ar																			0	0,2	0,26	0,2	0,06	0,1	0,2
1489	Guaiène <Cîs-B->					1,3	1,17	0,79			0,08	0,01	0,06		0,32	0,6	0,8	0,51	0,52	0,8	0,8	1,28	1,3	0,35	0,61	1,1
1494	Cadina-1,4-diène <cis->					1,29	1,19	0,88																		
1501	Epizarène															0,32	0,49	0,2	0,29							
1506	Cuprène<α->	0,13	0,17	0,14		1,13	1,19	0,82	0,14		0,05	0,02								0,4	0,4	0,4	0,4	0,12	0,19	0,3
1509	Germacrène A					0,08			0,03	0,1	0,14	0,07	0,06	0,05				0,04		0,1	0,5	0,71	0,6	0,15	0,24	0,4
1512	Amorphène<δ->									0,14								0,02		0	0,4	0,49	0,5	0,16	0,24	0,5
1529	Zonarène						0,13									0,36	0,43	0,25	0,27	0,4	1,8	2,37	2,1	0,65	1,03	2,1
1536	Cadinène <a->											0,02			0,44	0,72	0,94	0,55	0,54	0,9	1,8	2,04	2,1	0,56	0,96	1,8
1544	Sesquisabinène hydrate <cis-> (PP vs. OH)						0,07								0,45	0,67	0,88	0,46	0,58	0,8	2,6	2,58	2,7	0,75	1,25	2,2
1561	Germacrène <β->	0,2		0,12	0,06	0,14			0,13				23,1	0,27					3,86		0,2		1,4	0,72		0,1
1569	Isolemicin <(E)->		4,72	0,12		0,12	0,08	0,15	0,07	0,18	0,24	0,3	0,07	0,06												
1616	Himachalène oxide <13->						0,11								0,62	1,13	2,25	0,82	1,07	2,3	1	0,98	1	0,31	0,52	1
1663	Caryophyllène <14-hydroxy-(Z)->	0,23		0,22		0,08		0,04	0,05																	
1704	Amorpha-4,9-dien-14-al		0,2	0,08		0,17		0,08																		
1706	Thujopsenal <cis->	0,07		0,16		0,1		0,1																		
1758	Ambroxide											8,17														
1758	Cuparenal						0,77				4,62						0,16	1,28		0,2		1,97	0,5			0,4
1766	curcumen- 15-al y>												0,09								2,1					
1808	Cadinène <14-hydroxy-δ->	0,23	0,33	0,87	0,78			0,37																		
1845	Ternine <(Z)->		0,34	1,37				0,2																		
1880	Laurène	0,2		0,49	0,25		0,34		0,65																	
1914	Valencène <11,12-dihydroxy->	0,32		1,27	0,06																					
1921	Totarène	1	0,16	0,31	0,11		0,89	0,34																		
1931	Beyerène Procerin				0,19		0,42	0,21																		
1959	Nootkatin				0,81		0,57																			
1964	Callistrisin <dihydro->				0,27		1,08																			
	Total (%)	7,5	5	8,9	5	4,5	7,4	9,2	6	4,3	13	14	3	5,2	3	3,6	4,3	4	2	3	1	3	1	0	0	1

Alcools	1137	Mentha-2,8-dien-1-ol <Cis- ρ ->														0,53	0,69	0,63	0,45	0,39	0,3	0,1	0,14	0,1	0,04	0,06	0,1	
	1152	Thujanol <neo-3->														0,52	0,78	0,88	0,37	0,41	0,5	0,1	0,12	0,1	0,03	0,04	0,1	
	1182	Menthol <iso->														0,12	0,17	0,11	0,12	0,07	0,1	0	0,02		0,01	0,01	0	
	1192	Mentha-1(7),8-dien-2-ol<trans- ρ ->		0,2	1,54		0,04																	0				
	1192	Cymen-7-ol < ρ ->					0,17																					
	1193	Dihydro carveol					0,12	0,12	0,14	0,14	0,15	0,11	0,05		0,05	0,6	0,63	0,02	0,73					0,08				
	1212	Dihydro carveol <iso->	0,26	0,11	0,17	0,1							0,02			0,06	0,1	0,12	0,06	0,05	0,6	0						
	1216	Carveol <trans->	0,13				0,06	0,04	0,05	0,05	0,04		0,01	0,04								0	0,02	0				0
	1231	Mentha-1(7),8-dien-2-ol <cis- ρ ->						0,09	0,11	0,07		0,02																
	1283	Anéthole <(E)->	2,16	1,98	2,12	2,11	3,79	3,8	3,74	4,16	3,63	5,36	3,13	2,54	3,74	0,3	0,53	1,02	0,51	0,61	1,3	0,5	0,49	0,4	0,09	0,15	0,3	
	1302	Cinnamyl alcohol <(E)->														0,36	0,64	0,57	0,36	0,39		0,1	0,18		0,06	0,11	0,2	
	1448	Isoeugenol <(E)->	1,58	1,27	0,14								0,02															
	1534	Cubebol<10-epi->					0,03			0,26	0,09	0,02																
	1634	Eudésmol < γ ->												0,06		0,01	0,01	0,08			0,3	0						
	1645	Cadinol<epi-a->														0,01	0,06	0,04	0,01	0,02	0,1	0	0,01	0				
	1647	Cubebol							0,11	0,13																		
	1659	Bisabolol oxide B <11->					0,06	0,13																				
	1678	Apiole					0,18		0,28																			
	1680	Helifolenol C							0,06	0,07	0,05	0,05	0,02															
	1684	Helifolenol D							0,2	0,07	0,04	0,03	0,02															
	1701	Eudesm-7(11)-en-4-ol					0,06		0,12	0,14																		
	1746	Khusimol												1,32														
	1753	Curcumen-12-ol< ρ ->					0,15	0,12																				
	1886	Cedranediol <8S,14->	0,35	0	2,44	0,13	0	0,11	1,11	0,34																		
	1896	Cedranediol <8S,13->	1,09	0,76	1,05	0,99		1,35	1	1,05		7,49	11	0,48				0,21	1,4		0,3		1,89	0,8			0,6	
	1912	Kudtdiol	0,65		0,45	0,22																						
	1988	Manool oxide				1,06		0,18	0,8																			
2089	Nootkatinol	1,26	0,65	1	0,2		1,43	1,68					0,32				0,68		0,28									
	Total (%)	7,5	5	8,9	5	4,5	7,4	9,2	6	4,3	13	14	3	5,2	3	3,6	4,3	4	2	3	1	3	1	0	0	1		
Aldéhydes	1041	Benzène acétaldéhyde													4,81	3,84												
	1066	Tolualdéhyde <meta->	0,4		1,91										0,02	0,1	0,02	0,11	0,07		0,1	0,04	0	0,1	0,08			
	1081	Tolualdéhyde < ρ ->	0,79	0,79	0,31	0,57	0,24	0,29	0,22	0,28			0,13	0,15	0,01	0,04	0,09	0,02	0,03		0	0,01	0	0	0,01	0,1		
	1355	Trimethyl benzaldéhyde <2,3,6->					0,05				0,05	0,04	0,01	0,02				0,02										
	1561	Cinnamaldéhyde<(E)- ρ -methoxy->				0,11		0,08																				
1726	Cinnamaldéhyde <4-hydroxy-3-methoxy->	0,11		0,23	0,1																							
	Total (%)	1,3	0,8	2,5	1	0,3	0,4	0,2	0	0,1	0	0	0	0,2	5	4	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

Cétones	1119	Sabina ketone <dehydro>	2,4	2,24		1,95	2,17	2,82	2,23	2,48	2,3	2,07	0,94	1,88	2,78	0,19	0,3	0,63	0,15	0,35	0,8	0,3	0,2	0,2	0,04	0,08	0,1	
	1170	Umbellulone														0,5	0,66	0,63	0,35	0,32	0,3	0,1	0,13	0,1	0,03	0,04	0,1	
	1205	Verbenone	0,14		0,2										0,06													
	1235	Ocimenone <(E)->	0,11		1,02		0,07	0,08	0,07	0,12	0,06	0,12	0,06	0,04	0,05													
	1299	Acetophenone <3'-methoxy>								0,09			0,02								0,5			0,2				
	1573	Asarone <γ>						0,13			0,11	0,02																
	1575	Zierone	1,58		0,11							0,03																
	1608	Biotone B	0,85	0,57	0,21	0,81	1,18	1,19	1,62	1,21	1,13	4,58	7,51	0,92	0,73	0,05	0,11	0,25	1,52	0,09	0,3	0,1	2,2	0,5	0,03	0,03	0,3	
	1642	Thujopsanone <3-iso>					0,04	0,15	0,05	0,17																		
	1692	Acorenone		0,17	0,12	0,19				0,16																		
	1697	Acorenone B				0,19				0,04																		
	1698	Agglomerone		0,27	0,18		0,03																					
	1717	Atlantone<Z>-α->	0,13		0,16	0,32	0,22		0,21				0,26															
	1738	Eremophilone	0,51		0,49	0,22		0,2					0,03															
	1758	Cyclocolorenone	0,86		0,12	0,1			0,81	0,77			0,04		0,4													
	1762	Aristolone	0,11		0,17							0,08																
	1808	Nootkatone		0,23	0,4	0,19						0,12																
	1811	Acorone <iso>	0,25		0,39	0,49																						
	1820	Acorone	0,14	0,35	0,44	0,11		0,25																				
	1824	Vetivone <β>	0,65	0,16	2,05	0,65			0,24	0,46					0,1													
2115	Laurenan-2-one	0,58	0,27	0,25	1,48		1,05																					
		Total (%)	8,3	4,3	6,3	7	3,7	5,9	5,4	6	3,6	7,2	8,5	3	3,6	1	1,1	1,5	2	1	2	0	3	1	0	0	0	
Acétates	1197	Methyl heptine carbonate		0,14	0,26	0,13																						
	1363	Carvyl acétate <cis>							0,13		0,15					0,35	0,51	0,73	0,39	0,49	0,5	0,7	0,65	0,6	0,19	0,31	0,5	
	1548	Allyl cinnamate <(E)->					1,92	1,63	1,11																			
	1784	Eudésmol acétate <γ>	0,28		1,09				0,21				0,4	4,41														
	1796	Eudésmol acétate <α>	0,21	0,11	2,11	0,13		0,18	0,23	0,16			0,05															
	1841	Eudesm-7(11)-en-4-ol, acétate	0,4	0,06	0,48	0,24		0,24	0,13	0,11																		
2094	Benzyl cinnamate				0,7	0,44																						
		Total (%)	8,3	4,3	6,3	7	3,7	5,9	5,4	6	3,6	7,2	8,5	3	3,6	1	1,1	1,5	2	1	2	0	3	1	0	0	0	
		% Total des composés	37	30	43	29	37	45	39	30	26	35	36	37	26	94	93	86	93	89	84	96	95	93	98	97	97	

M.R : Racines de Médéa ; B.R : raciness de Béjaia ; B.F : feuilles de Béjaia ; M.F : feuilles de Médéa

0,1 KGy; 0,3 KGy; M.F 0,7 KGy ; 1 KGy ; 3 KGy ; 7 KGy; 10 KGy : doses d'irradiation gamma

Tableau 11 b : Composition chimique qualitative et quantitative des volatiles des racines et feuilles de *T.garganica* identifié avec l'analyse HS-SPME en utilisant la fibre PDMS/DVB

Classes chimiques	KI(X) Adams (2007)	Echantillons	M.R. 85 μm			M.R. 250 μm			B.R. 85 μm			B.R. 250 μm			F.B. 250 μm			F.M. 250 μm			B.F. 0,1 KGy	B.F. 0,1 KGy	B.F. 0,3 KGy	B.F. 0,3 KGy	B.F. 0,7 KGy	B.F. 0,7 KGy	B.F. 1 KGy	B.F. 1 KGy	B.F. 3 KGy	B.F. 3 KGy	B.F. 7 KGy	B.F. 7 KGy	B.F. 10 KGy	B.F. 10 KGy	B.R. 0,1 KGy	B.R. 0,3 KGy	B.R. 0,7 KGy	B.R. 1 KGy	B.R. 3 KGy	B.R. 7 KGy	B.R. 10 KGy			
			Masses (g)	0,1	0,05	0,02	0,1	0,05	0,02	0,1	0,05	0,02	0,1	0,05	0,02	0,2	0,1	0,05	0,2	0,1	0,05	0,05	0,1	0,05	0,1	0,05	0,1	0,05	0,1	0,05	0,1	0,05	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1					
		Composés																																										
Terpénoïdes	812	Norbornène <S-méthylène-2->	6,72	7,12	7,59	8,38	7,04	3,66	2,2				2,6	1,99	2,74	4,92	7,47	6,47	7,59	3,48	2,99	3,57	3,25	6,43	7,11	6,67	6,37	7,2	6,41	7,86	6,42	6,44	7,8	8,2	6,68	9,08	4,63	8,62	10,1	3,76	4,86	6,93		
	939	Pinène <α->								0,04	0,09				0,04																											0,1		
	950	Fenchène <α->	0,5	0,45	0,31	0,29	0,25	0,06		0,26	0,57	1,09	0,42	0,97	0,89	0,67	0,76	1,06	0,43	1,32	0,73	1,45	1,04	1,23	0,6	1,28	1	1,16	0,48	0,79	0,77	0,71	0,95	0,7	1,04	0,63	0,51	1,22	0,3	0,36	0,6			
	955	Camphène	0,11	0,14	0,05	0,17	0,1	0,28	0,07		0,19		0,17		0,5	0,4		0,12	0,05		0,22		0,13	0,23	0,87			0,63	0,29	0,15		0,2	0,07		0,63	0,28			0,06	0,09				
	960	Thuja-2,4(0)-diène							0,11					0,06	0,21	0,13							2,33		0,25	0,15	0,2		0,2	0,18				0,35	0,22	0,11	0,15	0,04						
	971	Verbènène	5,14	5,46	6,02	6,16	5,84	6,01	2	2,31	2,45	2,62	2,18	3,4	6,57	6,52	5,86	7,62	3,66	4,4	6,41	7,35	6,37	7,23	6,18	6,61	6,8	6,18	6,56	6,3	6,06	7,77	7,02	6,98	7,52	6,5	8,95	7,92	4,16	4,62	6,19			
	1088	Mentha-2,4(8)-diène <po>	0,13	0,13	0,14	0,14	0,09	0,17	0,05	0,08	0,05	0,05	0,09	0,06	0,16	0,14		0,14	0,2	0,1	0,12	0,12	0,11	0,13	0,14	0,12	0,1	0,08	0,12	0,13	0,14	0,15	0,14	0,13	0,16	0,15	0,28	0,16	0,12	0,07	0,08			
	1111	Menthatriène <1,3,8-p>	0,37	0,35	0,37	0,38	0,35	0,3	0,09	0,23	1,63		0,3	0,54	0,85	0,94	0,51	0,42	0,26	0,73	0,52	0,54	0,61	0,94	0,84	0,53	0,6	0,67	0,73	0,78	0,51	0,6	0,54	0,58	0,58	0,53	0,69	0,57	0,24	0,34	0,47			
	1198	Shisofuran	0,1	0,12	0,13	0,13	0,1	0,11	0,03	0,04		0,05	0,05	0,06	0,14	0,14	0,14	0,13	0,05	0,09	0,1	0,11	0,1	0,12	0,13	0,15	0,1	0,1	0,1	0,12	0,14	0,13	0,12	0,11	0,36	0,14	0,18	0,16	0,11	0,11	0,14			
	1344	Silphinène	0,06							0,03	0,02	0,02	0,04	0,02		0,06		0,06	0,03		0,02					0,05		0,04	0,06		0,05		0,1		0,06		0,07	0,07	0,03	0,06	0,07			
	1354	Longipinène <β->	0,05	0,06	0,05		0,05		0,01	0,03	0,01	0,02	0,02	0,02		0,06		0,03		0,04		0,06				0,1		0,06		0,06				0,06	0,05	0,06		0,03		0,03	0,06			
	1412	Funcène <2-epi-p>	0,15	0,09	0,14	0,18	0,1	0,13	0,14	0,14	0,03	0,07	0,17	0,07	0,16	0,12	0,13	0,13	0,21	0,09	0,15	0,14	0,13		0,13	0,14	0,1	0,15	0,13	0,13	0,14	0,13	0,12	0,17	0,14	0,09	0,09	0,13	0,2	0,04	0,06			
	1473	Acoradiène <β->	0,08	0,17	0,12	0,11	0,12	0,12	0,02	0,02	0,05	0,06	0,04	0,09	0,17	0,12	0,11	0,15	0,1	0,1	0,13	0,17	0,16	0,16	0,12	0,13	0,1	0,14	0,12	0,12	0,17	0,14	0,22	0,16	0,16	0,22	0,2	0,17	0,08	0,1	0,14			
	1507	Cuparène	0,08		0,38	0,15						0,05															0																0,14	
	1507	Germacrène A						0,12	0,07	0,1	0,03		0,06	0,07	0,1	0,11		0,09																										
	1526	Cadillène <δ->						0,18	0,01	0,04									0,04																									
	1535	Cadinène <α->						0,06	0,09	0,11		0,02								0,12	0,06				0,11																			
	1550	Elemicin	0,27	0,39		0,2	0,45	0,24	0,13	0,17	0,25	0,07	0,09	0,12					0,13						0,15																	1,02		
	1561	Germacrène B	0,06	0,21	0,16	0,18	0,2				28,7	5,41	10,6	8,44	0,36	0,37	0,23	0,38	0,15	18	0,34	0,3	0,27	0,28	0,54	0,27	0,3	0,25	0,26	0,26	0,31	0,31	0,3	0,3	0,34	0,25	0,2	0,25	0,07	18,4	0,29			
	1570	Isolemicin <E>	0,06	4,15	4,44	0,1	0,1	8,16		0,02						0,12	0,12	0,07	0,09	0,22		0,11	0,09	0,06			0,1	0,13	0,09	0,07	0,1	0,1	0,09	0,14	0,11	0,13	0,28		0,2		0,04			
	1581	Pygmaein				1,29	2,25		0,02											0,03																		1,94				0,91		
	1758	Cuparénal	1,57	0,13																																								
	1768	Murolène <14-oxo-α->	0,23	0,08																																								
1770	Valencène <β-hydroxy->	0,11	0,05																																									
1781	Murolène <14-hydroxy-α->	0,11	0,15																																									
Total (%)			16	19	20	18	17	20	5	34	12	16	17	15	17	14	18	9,1	28	13	16	15	17	17	16	17	15	17	15	16	15	18	18	16	20	16	21	21	10	30	15			

Aldéhydes	1082	Tolualdéhyde <po>	0.24	0.24	0.27	0.23	0.15	0.23	0.08	0.1	0.09	0.13	0.09	0.11	0.32	0.26	0.32	0.27	0.17	0.17	0.2	0.24	0.21	0.25	0.27	0.3	0.2	0.21	0.26	0.25	0.25	0.3	0.22	0.23	0.24	0.25	0.19	0.28	0.12	0.13	0.2														
	1729	Cinnamaldéhyde <4-hydroxy-3-methoxy->	0.1	0.09																																																			
Total (%)			0,3	0	0,3	0,2	0	0,2	0	0,1	0	0,1	0,1	0	0	0	0,3	0	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0							
Cétones	1116	Sabina kétone <dehydro->	2,56	2,82	3,02	3,1	2,5	2,9	1,18	1,31	0,04	2,01	1,41	1,92	3,42	2,95	3,01	3,78	2,36	2,29	3,49	2,94	3,78	3,63	3,52	3,8	3,5	3,18	3,34	3,02	3,7	3,56	3,94	3,68	3,78	4,01	4,79	4,23	2,49	2,37	2,89														
	1237	Ocimenone <(E)->	0.1	0.1	0.09	0.09	0.06	0.07	0.05	0.06	0.02	0.04	0.06	0.03	0.09	0.08	0.05	0.09	0.09	0.05	0.1	0.06	0.1		0.09	0.09	0.1	0.09	0.1	0.09	0.11	0.06	0.08	0.12	0.06	0.08	0.1	0.07	0.09	0.04	0.0	0.0	0.6												
	1609	Biotone <β->	3,77	1,55	1,45	2,23	2,87	2,58	12	5,22	0,38	0,59	2,85	1,33	1,93	1,98	3,72	1,47	4,21	0,98	1,64	2,7	1,61	1,68	2,02	2,96	1,4	2,56	1,81	3,75	1,8	1,65	1,66	2,24	2,25	1,18	1,69	1,66	5,33	0,74	1,53														
	1692	Germacrone	0,04	0,09	0,06			0,24																																															
	1718	Atlantone<Z>-α->	0,17	0,13																																																			
Total (%)			6,6	5	4,6	5,4	5	5,8	13	6,6	0	2,6	4,3	3	5	5	6,8	5	6,7	3	5	6	5	6	6,9	5	6	5	7	6	5	6	6	6,1	5	7	6	8	3	4															
Alcools	1193	Dihydro carveol	0,12	0,13				0,03	0,05	0,04	0,05	0,05	0,03	0,13	0,1	0,08		0,05	0,08		0,06		0,15																								0,05								
	1216	Carveol <trans->				0,05				0,01																																													
	1231	Mentha-1(7),8-dien-2-ol <cis-ρ->	0,05	0,07	0,05	0,08	0,06	0,07	0,02	0,01	0,02	0,02	0,03	0,03		0,06	0,05	0,02		0,05		0,07	0,06	0,07	0,05	0,1				0,08	0,06		0,08	0,07	0,07	0,07	0,07		0,03	0,03	0,05														
	1280	Anéthole <(E)->	6	5,84	5,77	6,07	3,79	4,35	2,56	3,33	2,03	2,97	4,31	3,42	6,95	6,08	5,63	7,01	5,96	5,1	8	5,8	7,71	4,82	7,16	7,05	6,8	6,6	6,45	6,56	8,42	6,38	7,21	9,01	6,93	7,39	6,99	7,46	5,34	4,03	4,6														
	1586	Allo-cedrol	3,91			1,3				0,01	0,03	0,04	0,03					0,04				0,1	0,07		0,14	0,4	0,37				0,12		0,64				0,29		0,45	1,02															
	1597	Longiborneol			0,17	0,15	0,12	0,09	0,04	0,01	0,02	0,03	0,03				0,04		0,18	0,79	0,04	0,23		0,04	0,3	0,22		0,08		0,14	0,1	0,9	0,05	0,31	0,15	0,16																			
	1653	Eudésamol <α->	0,04	0,07																																																			
	1681	Helifolenol C	0,34	0,61	0,72	0,31	0,43																																																
	1684	Helifolenol D	0,12	0,13	0,24	0,14	0,05																																																
	1734	Curcumenol	0,07	0,13																																																			
1742	Khusimol	0,04	0,09																																																				
1774	Costol <γ->	0,25	0,16																																																				
Total (%)			11	7	7	8,1	4	4,5	3	3,4	2	3,1	4,5	3	7	6	5,8	7	6,1	5	8	7	8	5	7	7,3	8	7	6	7	8	6	8	9	8,6	8	7	8	5	5	6														
Acétates	1362	Carvyl acétate <cis->	0,14	0,1	0,16	0,13	0,11	0,1	0,05	0,07	0,03	0,04	0,08	0,05	0,12	0,12	0,12	0,11	0,1	0,06	0,05	0,08	0,08	0,09	0,06	0,09	0,1	0,09	0,14	0,1	0,06	0,09	0,09	0,07	0,11	0,09	0,1	0,12	0,07	0,04	0,0	0,0	0,8												
	1784	Eudésamol acétate <γ->	0,17	0,17																																																			
	1795	Eudésamol acétate <α->	0,14	0,32																																																			
Total (%)			0,5	1	0,2	0,1	0	0,1	0	0,1	0	0	0,1	0	0	0	0,1	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
% Total des composés			34	32	32	32	27	30	21	14	37	18	25	24	28	29	27	31	22	37	26	29	29	28	30	30	30	29	29	30	30	30	32	32	35	29	35	35	24	38	26														

M.R: Racines de Médéa; B.R: raciness de Béjaia; B.F: feuilles de Béjaia; M.F: feuilles de Médéa

0,1 KGy; 0,3 KGy ; M.F 0,7 KGy ; 1 KGy; 3 KGy ; 7 KGy ;10 KGy : doses d'irradiation gamma

V.1.1. Effet de la masse et du diamètre des particules sur la composition chimique de la volatil des racines et feuilles de *T.garganica* :

La **figure 40** montre que la variation de la masse des échantillons ainsi que le diamètre des particules n'influent pas sur la composition chimique quantitative des volatiles de *T.garganica* sauf pour le cas des racines de Béjaia (B.R) finement divisées (85 μ m) dont on a remarqué une légère variation de la composition en terme de terpénoïdes où la fibre PDMS/DVB a permis d'extraire un taux maximal de composés terpéniques pour une masse $m=0,02$ g (34% du total de la composition) contre 5% pour une masse de 0,1 g et 4% pour une masse de 0,05 g ; en comparant avec les racines moyennement divisées à 250 μ m (12%, $m=0,1$ g ; 16%, $m=0,05$ g ; 17%, $m=0,02$ g). Tandis que, les masses $m=0,1$ g et $m=0,05$ g ont permis une meilleure extraction des cétones de 13% et 6,6% du total de la volatile respectivement (**Fig.40a, b**).

Parallèlement on remarque que les racines de *T.garganica* sont plus riches en terpénoïdes comparées aux feuilles (**Fig.40a,b**) et l'analyse HS-SPME-GC-MS des racines moyennement divisées (250 μ m) de la région de Béjaia a permis d'identifier plus de composés terpéniques par rapport à celles de Médéa pour les aires de pics, suivantes B.R. $_{m0,1g}=32296158,11$, B.R. $_{m0,05g}=50638791,35$, B.R. $_{m0,02g}=36649879,84$ par rapport à M.R. $_{m0,1g}=13039537,34$, M.R. $_{m0,05g}=14589418,83$ et M.R. $_{m0,02g}=17756697,07$ respectivement (**Fig.40 b**).

Plus récemment, il a été trouvé que les hydrocarbures sesquiterpéniques et les monoterpènes oxygénés étaient prédominants dans les huiles de toutes les parties de la plante *T.garganica* originaire de la Tunisie (**Hassen et al.,2015**) dont le bicyclogermacrène (21,59-35,09%) constituait le produit principal dans la première classe de composés, tandis que le géraniol (3,31-14,84%) et le linalool (0,81-10,9%) étaient les plus importants dans cette dernière classe de composés. Des études récentes de l'huile volatile des parties aériennes de *T.garganica* ont montré des compositions très différentes de celle de l'huile de racine, dont le p-vinylguaïacol est le principal composant volatil des fleurs (62%), des feuilles (61%) et des tiges (59%) des plantes algériennes (**Ladjel et al.,2011**) , tandis que le chamazulène est le principal composant (49,2%) de *T. garganica* de l'Italie (**Casiglia et al.,2015**).

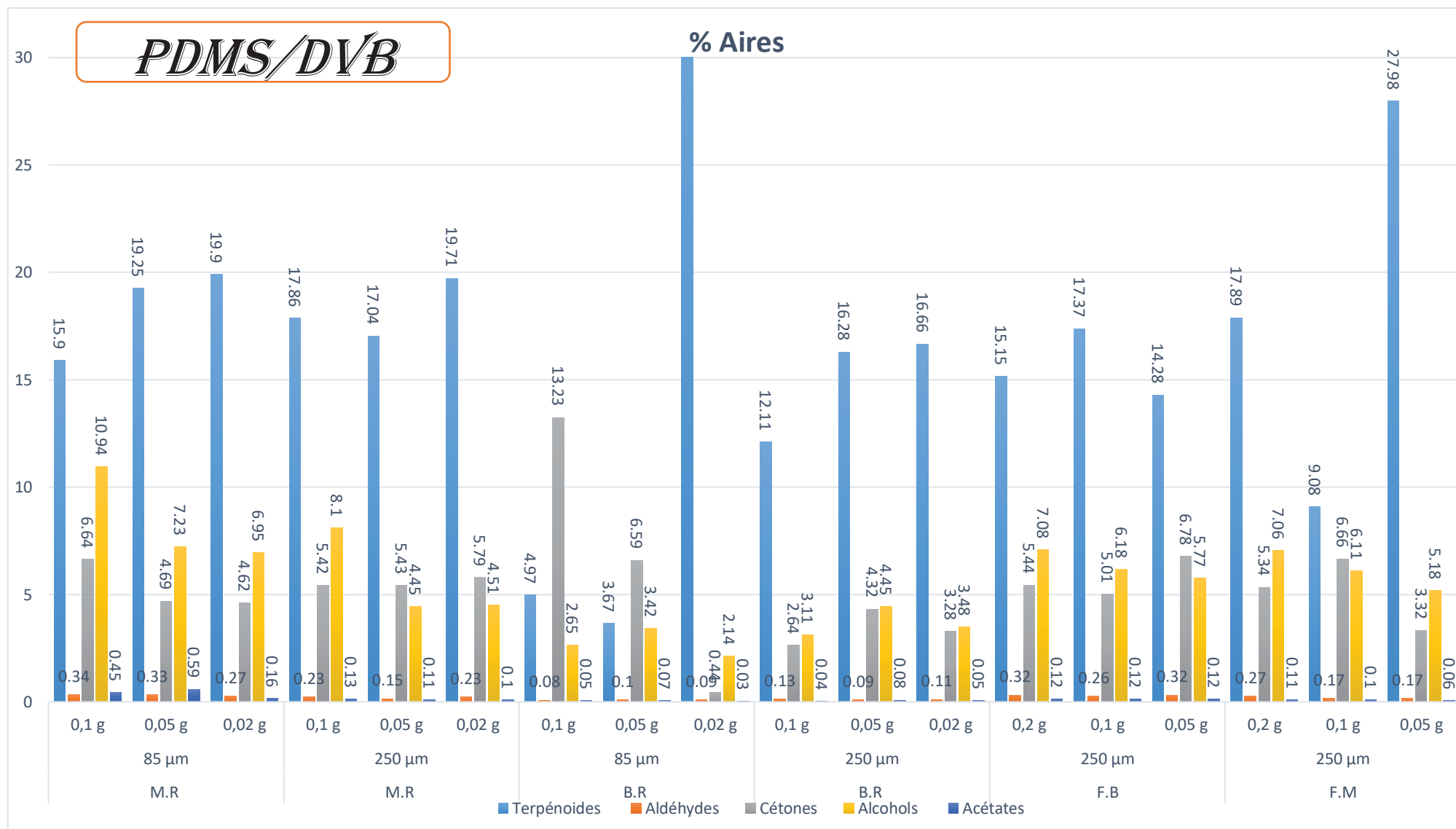


Figure 40 a : Principales classes chimiques des extraits de *T.garganica* des deux provenances selon la masse et le diamètre des particules

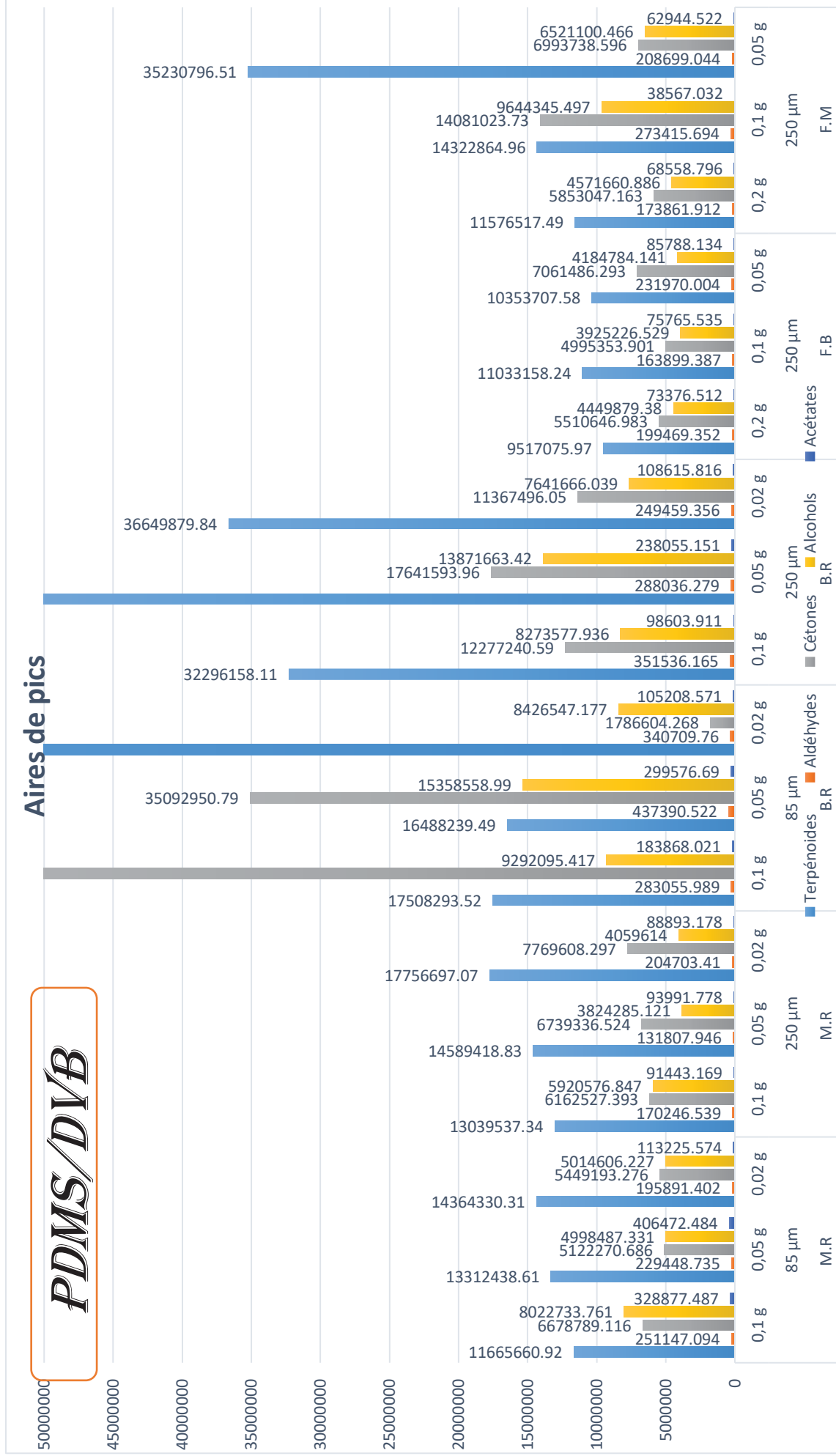


Figure 40 b : Principales classes chimiques des extraits de *T.garganica* des deux provenances selon la masse et le diamètre des particules

V.1.2. Principaux composés chimiques spécifiques aux différentes classes chimiques de *T.garganica* :

Pour l'évaluation de la variabilité chimique intraspécifique chez *T. garganica*, la composition des volatiles de feuilles et de racines de populations provenant des deux régions a été étudiée. Plus d'une centaine de composés ont été identifiés par la technique HS-SPME-CG-MS (**Tableau 11a,b**). La différence de composition est étroitement liée à la présence et aux taux des principaux composés majoritaires dans les différentes parties de la plante (**Fig.41 a,b**).

Dont, le **norbornène <S-méthylène-2->** en moyenne de 7% et 6,4% pour les racines de Médéa finement et moyennement divisées respectivement (85µm et 250µm), de 2,2% et 2,4% pour les racines de Béjaia finement et moyennement divisées respectivement (B.R. 85µm B.R. 250µm), et de 6,3% pour les feuilles de Béjaia (F.B.) à 250 µm, et 4,7% pour les feuilles de Médéa (F.M.) à 250 µm ; **verbenène** (en moyenne de 5,5% : M.R. 85 µm; 6% : M.R. 250 µm ; 2% :B.R. 85 µm ; 2,7% : B.R. 250 µm ; 6,3% : F.B. 250 µm ; 5,2% : F.M. 250 µm) ; **anéthole** (en moyenne de 5,87% : M.R. 85 µm; 4,7% : M.R. 250 µm ; 2,64% :B.R. 85 µm ; 3,6% : B.R. 250 µm ; 6,22% : F.B. 250 µm ; 6% : F.M. 250 µm) ; **biotone <β->** (en moyenne de 2,3% : M.R. 85 µm; 2,6% : M.R. 250 µm ; 5,9% :B.R. 85 µm ; 1,6% : B.R. 250 µm ; 2,5% : F.B. 250 µm ; 2,22% : F.M. 250 µm) et **sabina kétone <dehydro->** (en moyenne de 2,8% : M.R. 85 µm; 2,8% : M.R. 250 µm ; 0,8% :B.R. 85 µm ; 1,78% : B.R. 250 µm ; 3% : F.B. 250 µm ; 2,8% : F.M. 250 µm) sont les composés majoritaires présents dans tous les échantillons quelle que soit leur origine (**Fig.41**).

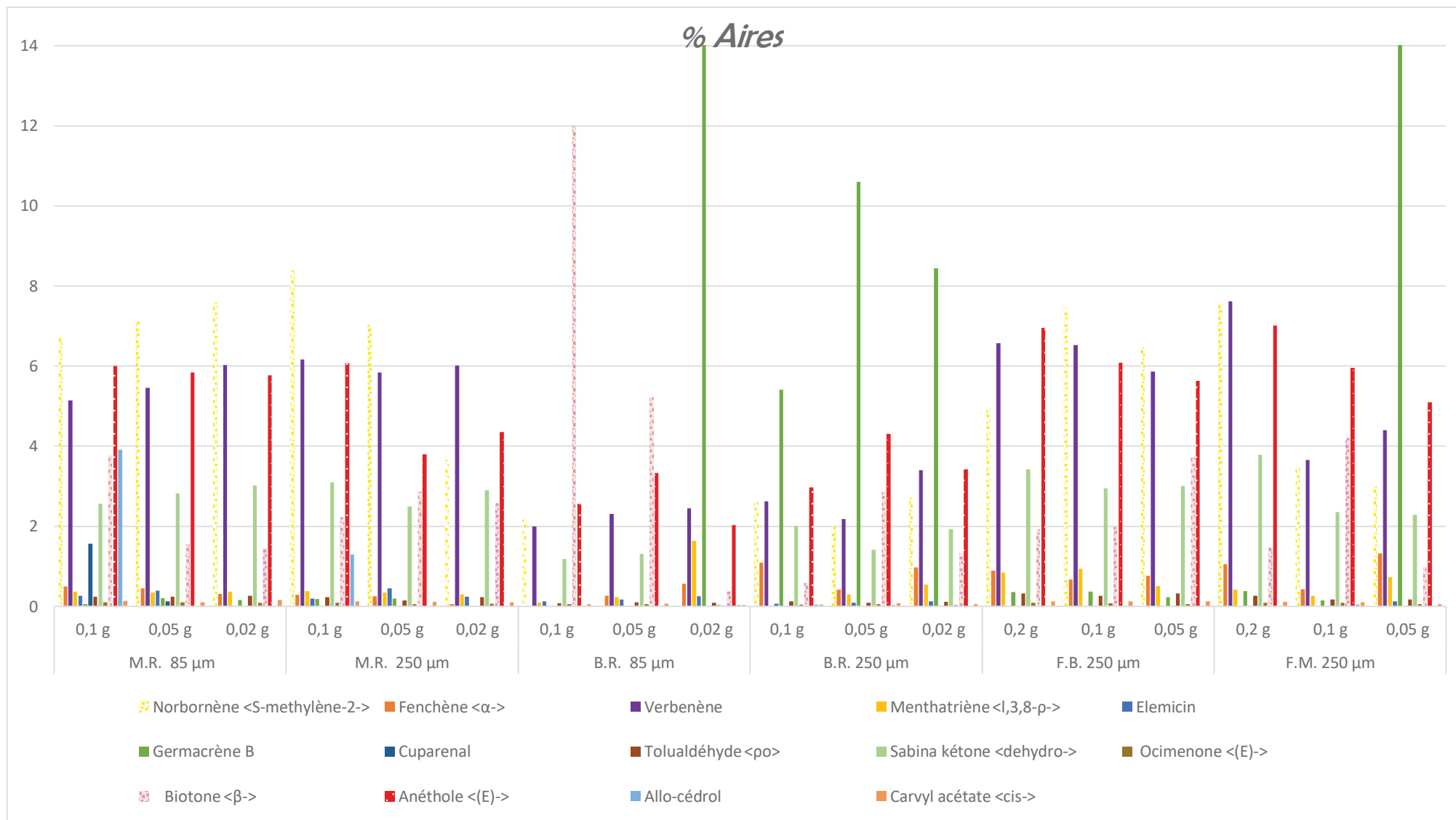


Figure 41 a : Pourcentage des principaux composés extraits à partir des différentes parties de *T. garganica* par la fibre PDMS/DVB selon la masse et le diamètre des particules

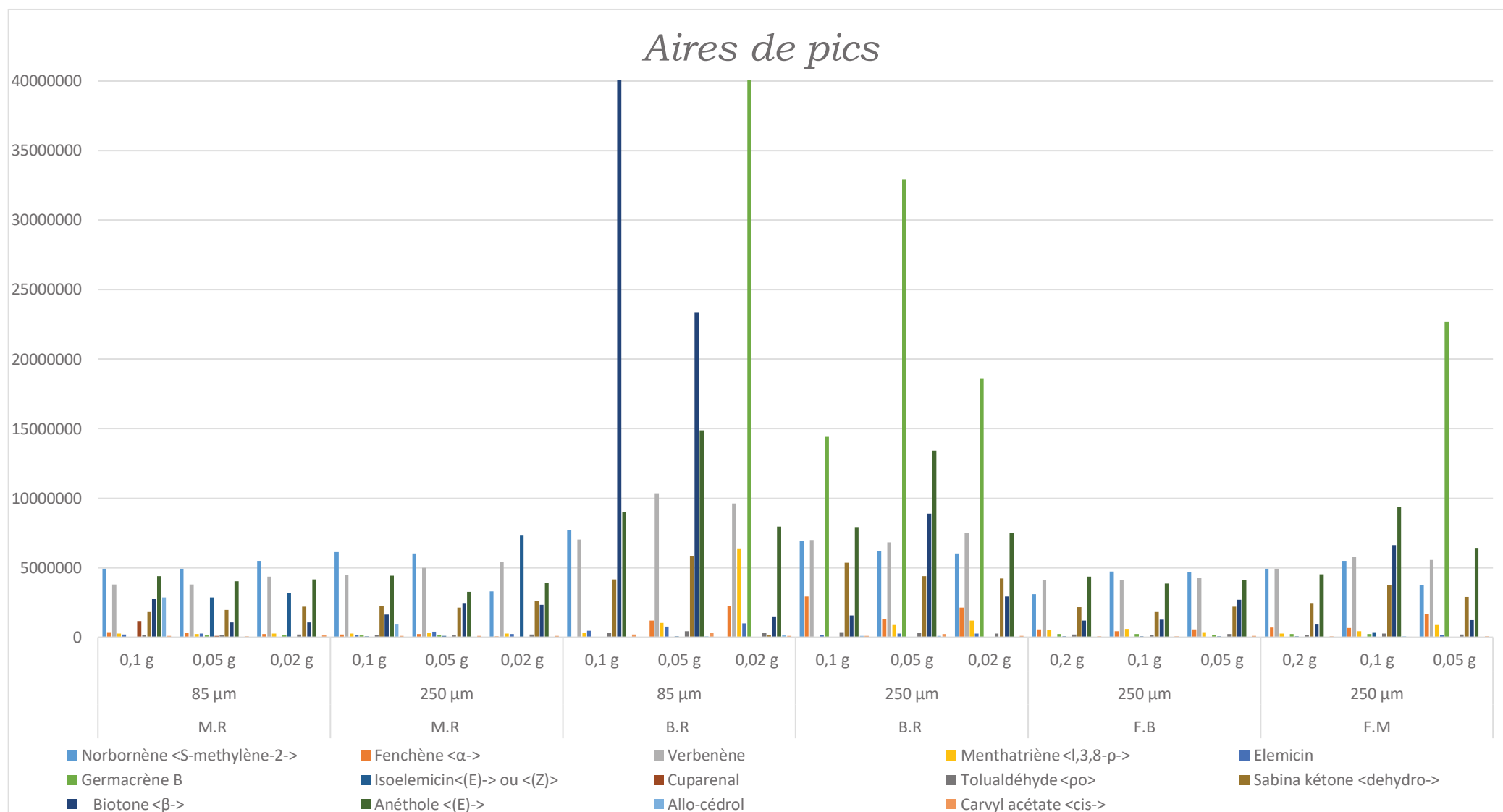


Figure 41 b : Aires de pics des principaux composés extraits à partir des différentes parties de *T.garganica* par la fibre PDMS/DVB selon la masse et le diamètre des particules

V.1.3. Etude quantitative et qualitative des principaux composés chimiques identifiés par la fibre PDMS (m=0.1g, dp=85µm) :

La fibre PDMS a permis aussi l'identification des mêmes composés majoritaires de *T.garganica* le **norbornène <S-méthylène-2->** en moyenne de 5,7% pour les racines de Médéa finement divisées par rapport à 6,7% en utilisant la PDMS/DVB (**Fig.42 a**), de 5,5% pour les racines de Béjaia (85µm) par rapport à 2,2% (PDMS/DVB) , de 5% pour les feuilles de Béjaia (85µm) par rapport à 7,5% à 250 µm, et de 5,2% pour les feuilles de Médéa (85µm) par rapport à 3,5% broyées à 250 µm ; le **verbenène** (en moyenne de 5,4% (PDMS) par rapport à 5% (PDMS/DVB) pour M.R. divisées à 85 µm ; de 4,4% (PDMS) par rapport à 2% (PDMS/DVB) pour B.R. divisées à 85 µm ; de 4% pour F.B. divisées à 85 µm par rapport à 6,5 % divisées à 250 µm (PDMS/DVB) ; et de 4,5% (PDMS) pour F.M. divisées à 85 µm par rapport à 3,6% divisées à 250 µm) ; l'**anéthole** (en moyenne de 2% (PDMS) par rapport à 6% (PDMS/DVB) pour les racines de Médéa (85µm), et feuilles de Médéa et Béjaia broyées à 250 µm. Et de 2% pour les racines de Béjaia finement divisées à 85 µm par rapport au taux de 2,5% enregistré lors de l'utilisation de la fibre PDMS/DVB) ; tandis que le **biotone <β->** et le **sabina kétone <dehydro->** ont été identifiés à des taux plus faibles par rapport aux échantillons analysés par la fibre PDMS/DVB (en moyenne de 0,85%, 0,57% par rapport à 3,8%, 12% pour M.R. et B.R. (85 µm) respectivement et de 0,21% et 0,81% pour F.B. et F.M. (85 µm) par rapport à 2% et 4,21% F.B. et F.M. (250 µm) respectivement.

De ce fait, on constate que la fibre PDMS a permis l'identification des mêmes composés majoritaires que ceux identifiés par la fibre PDMS/DVB (**Fig.42b**).

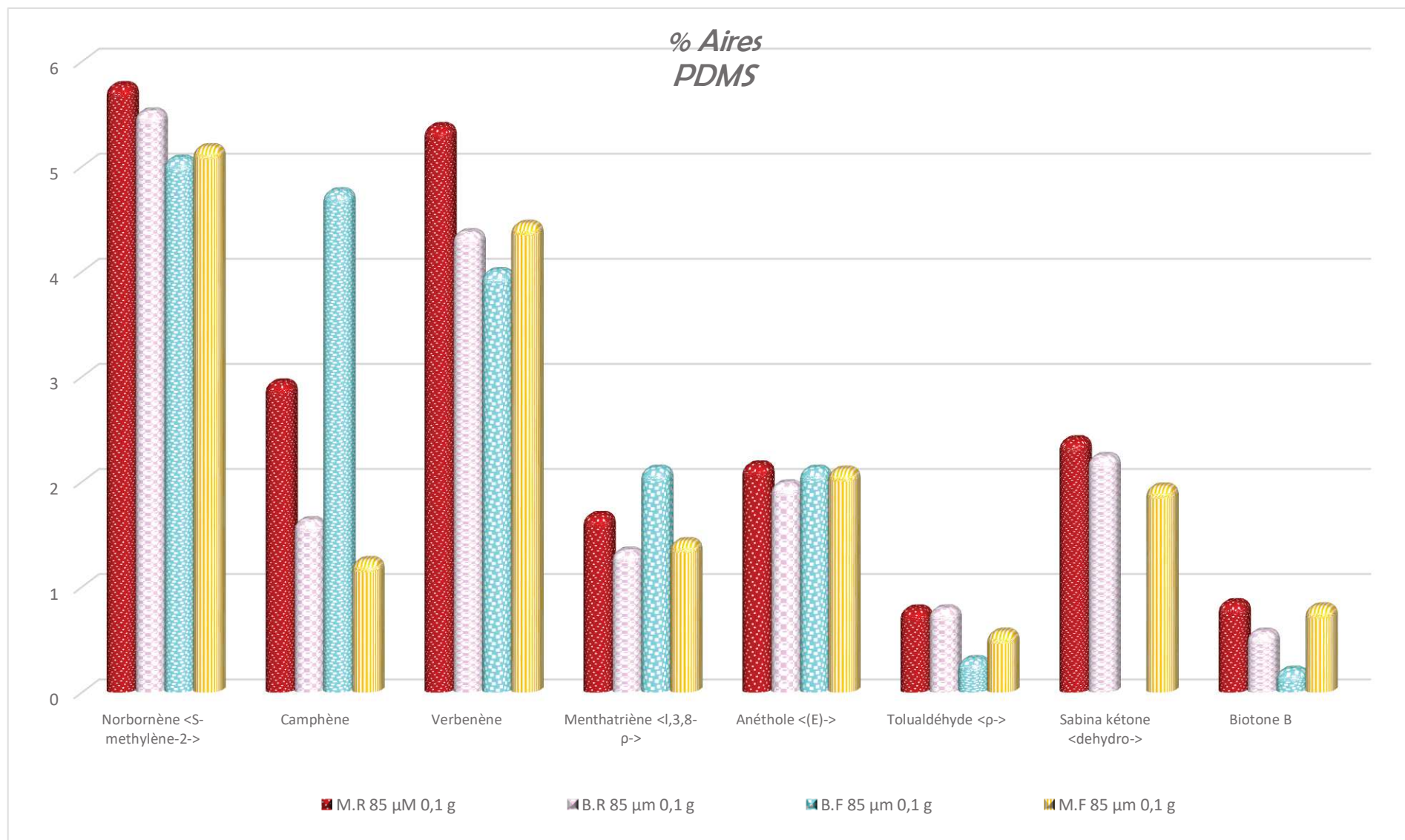


Figure 42 a : Principaux composés extraits à partir des différentes parties de *T.garganica* provenant de Médéa et Béjaia par la fibre PDMS

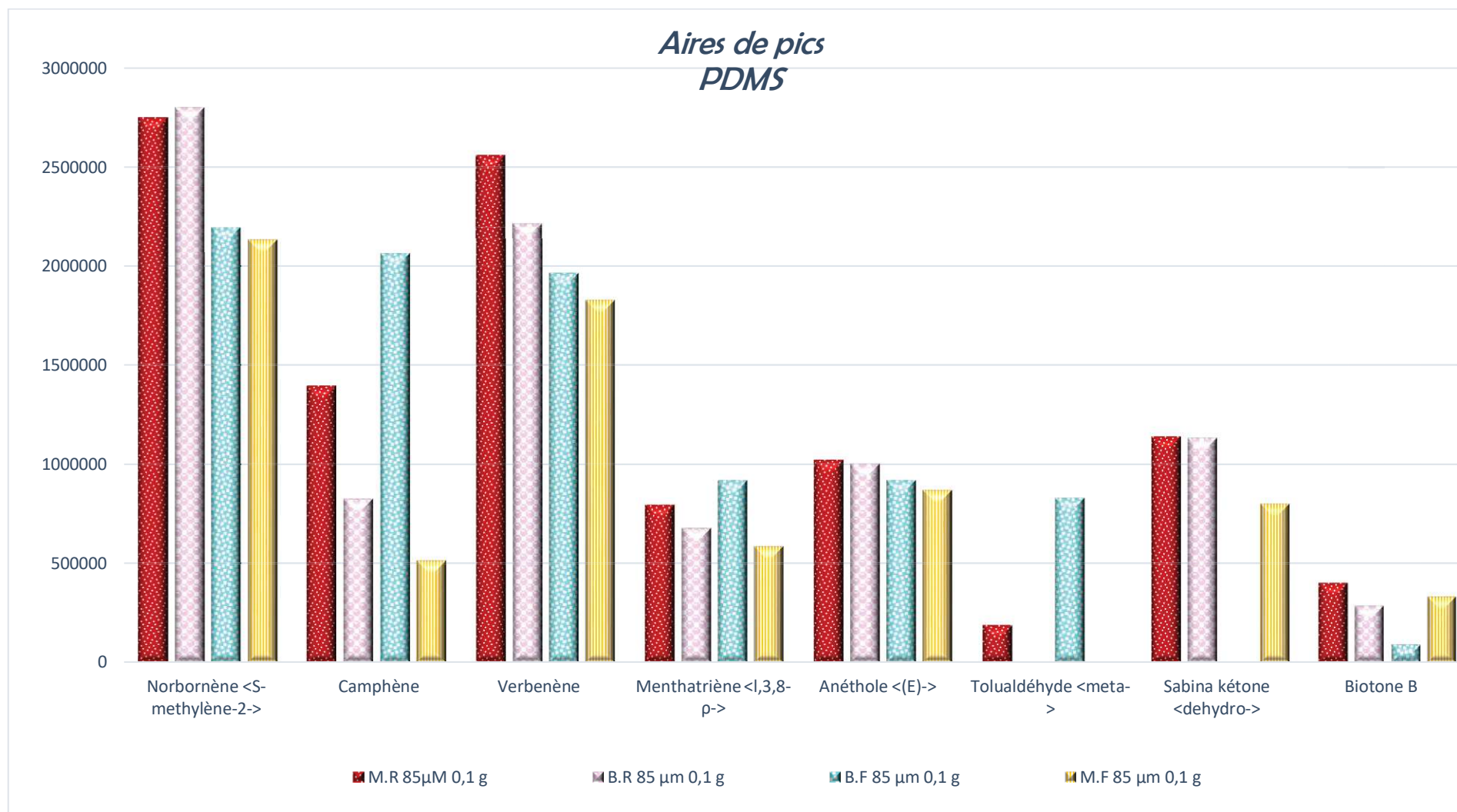


Figure 42 b : Aires de pics des principaux composés extraits à partir des différentes parties de *T.garganica* provenant de Médéa et Béjaia par la fibre PDMS

Il n'y a eu aucune autre étude montrant que la β -thujone en tant que constituant majeur chez *T.garganica*. Ce qui est en désaccord avec les résultats du travaux de **Hassen et al., (2015)**, dont leurs analyses ont permis l'identification de trente-sept composés représentant 97,01% de la composition totale de l'huile de l'écorce de racine de *T.garganica* extraite par hydrodistillation qui sont principalement la myristicine, la β -thujone et l'élémidine contribuant respectivement à 15,07%, 14,86% et 13,06% du total.

La présence d'autres composants, à savoir le fenchène < α ->, le menthatriène <1,3,8- ρ ->, l'élémicine, le cuprenal, le tolualdéhyde < ρ > et l'ocimène <(E)->, étaient caractéristiques de la volatile des racines et des feuilles de Béjaia et Médéa. Tandis que des teneurs plus élevées en sesquipo-mandrénone, α -terpinen-7-al, β -cyclocitral, cis- et trans-piperitol, bornéol et chrysanthénone ont permis de distinguer l'huile de racine de celles des autres organes (**Hassen et al.,2015**).

D'autre part, et pour un **cas exceptionnel**, la volatil des racines de *T.garganica* de Béjaia s'est avérée riche en **germacrène B** variant entre 6% à 28,7% de la composition totale. **Drew et al. 2012**, ont en outre postulé que les terpènes synthases impliquées dans la biosynthèse des sesquiterpènes dérivés du germacrène sont susceptibles d'être des enzymes multi-produits qui sont conservées dans les espèces de Thapsia. Ceci a été constaté chez l'espèce *T. garganica* étudiée par **Hassen et al., 2015**, dont les résultats ont montré l'abondance des sesquiterpènes dérivés du germacrène, comme le b-caryophyllène, l'humulène, le bicyclogermacrène et l' α -, γ - et Δ -cadinène.

De ce fait, cette composition spécifique des organes des huiles volatiles pourrait être attribuée à l'expression spécifique des gènes de terpène-synthase dans la plante *T. garganica* (**Hassen et al., 2015**). Selon **van Damme,(2001)**, les tissus en dessous et au-dessus du sol subissent différentes pressions de sélection environnementale abiotique et biotique, ce qui peut expliquer les différences générales dans les profils de métabolites entre les organes.

Conclusion :

Cette composition d'extrait spécifique à un organe a été discutée en relation avec leurs fonctions biologiques et écologiques. Cependant, une relation bien claire a été révélée entre la composition de la volatile et la distribution géographique et les conditions pédoclimatiques des populations étudiées. Mais pas un lien avec les conditions opératoires (choix de la masse des particules de la plante broyées). Tandis que, la variation de la composition a été enregistrée en terme d'affinité des analystes à la polarité de la fibre utilisée. Une telle différence de composition des plantes pourrait être liée à leurs fonctions biologiques et écologiques ce qui a

été confirmé avant lors de la distribution spatiale des composants volatils entre les parties des plantes (Hassen *et al.*,2015). En effet, Gardeli *et al.* (2008) ont constaté que des facteurs environnementaux, tels que la géographie, la température, la photopériode et les nutriments, jouent un rôle dans la composition chimique des huiles essentielles.

V.1.4. Effet de rayonnements gamma sur le profil chimique qualitatif et quantitatif de la volatile des différentes parties de *T.garganica* :

V.1.4.1 Effet de l'irradiation gamma sur les classes chimiques que contient *T.garganica* originaire de Médéa :

Afin de d'étudier l'effet de l'irradiation gamma sur l'aspect qualitatif et quantitatif du profil chimique de la volatile de *T.garganica*, une analyse HS-SPME-CG-MS a été effectuée sur des feuilles de Thapsia originaire de Médéa irradiées à différentes fréquences gamma. Les résultats sont rapportés sur la **figure 43** (a,b) dont on remarque une meilleure extraction des composés volatiles par la fibre PDMS à des grandes fréquences d'irradiation et surtout pour la masse $m=0,1$ g, cela plus spécifiquement pour les terpénoïdes qui atteignent: 86,05% (0,7 KGy) ; 83,48% (1 KGy) ; 79,66% (3 KGy) ; 86,72% (7 KGy) et 85,13% (10 KGy); en comparant avec les taux extraits avec une masse $m=0,2$ g [22,44% (0,7 KGy); 17,92% (1 KGy) ; 18,07% (3 KGy) ; 14,44% (7 KGy) et 13,58% (10 KGy)].

Ces résultats montrent l'effet exercé par les rayons gamma et de la masse des échantillons choisis sur le profil chimique des principales classes chimiques que contient la plante.

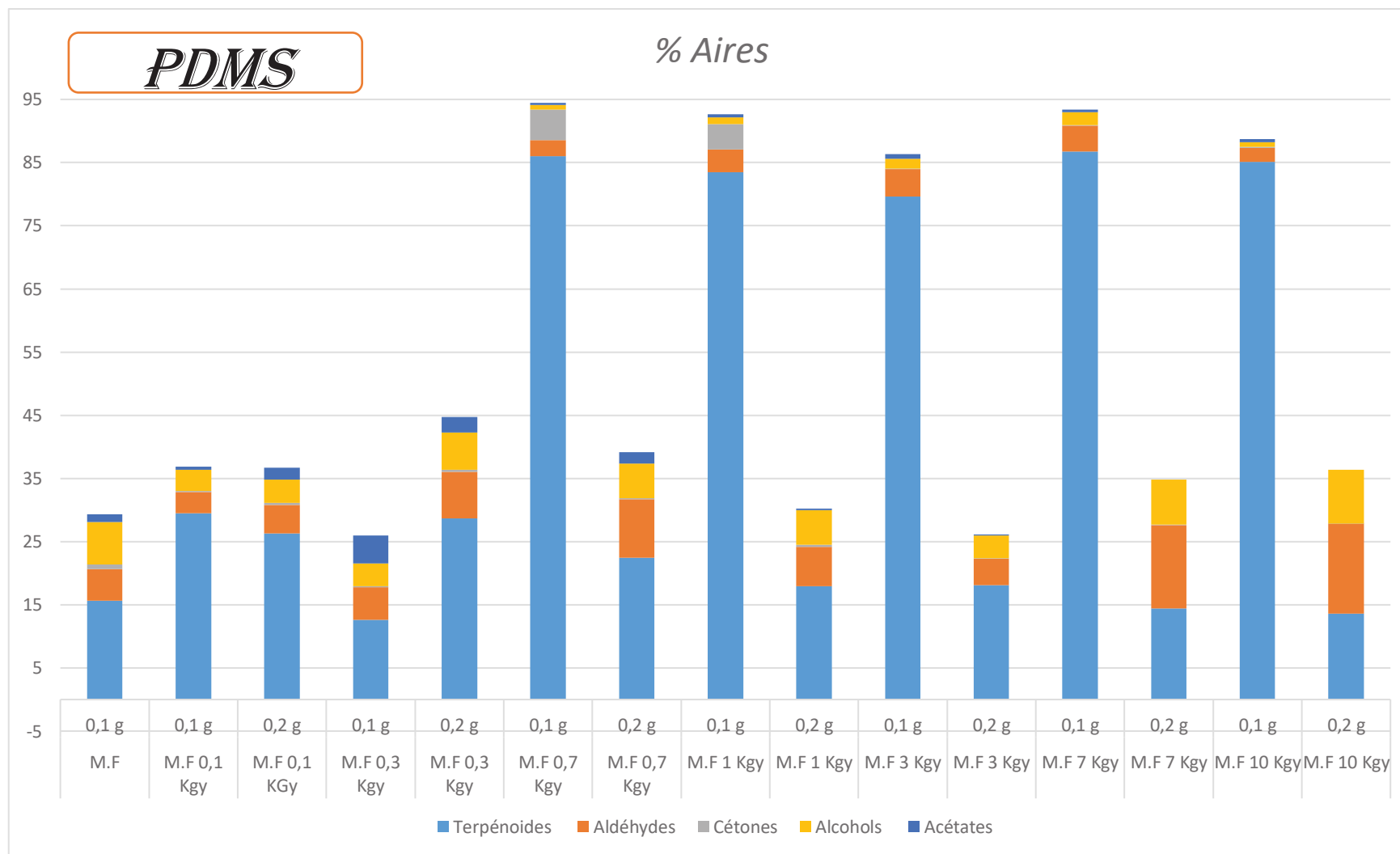


Figure 43 a : Influence de l'irradiation gamma sur les principales classes chimiques des feuilles de *T.garganica* provenant de Médéa selon la masse, analysées par la fibre PDMS

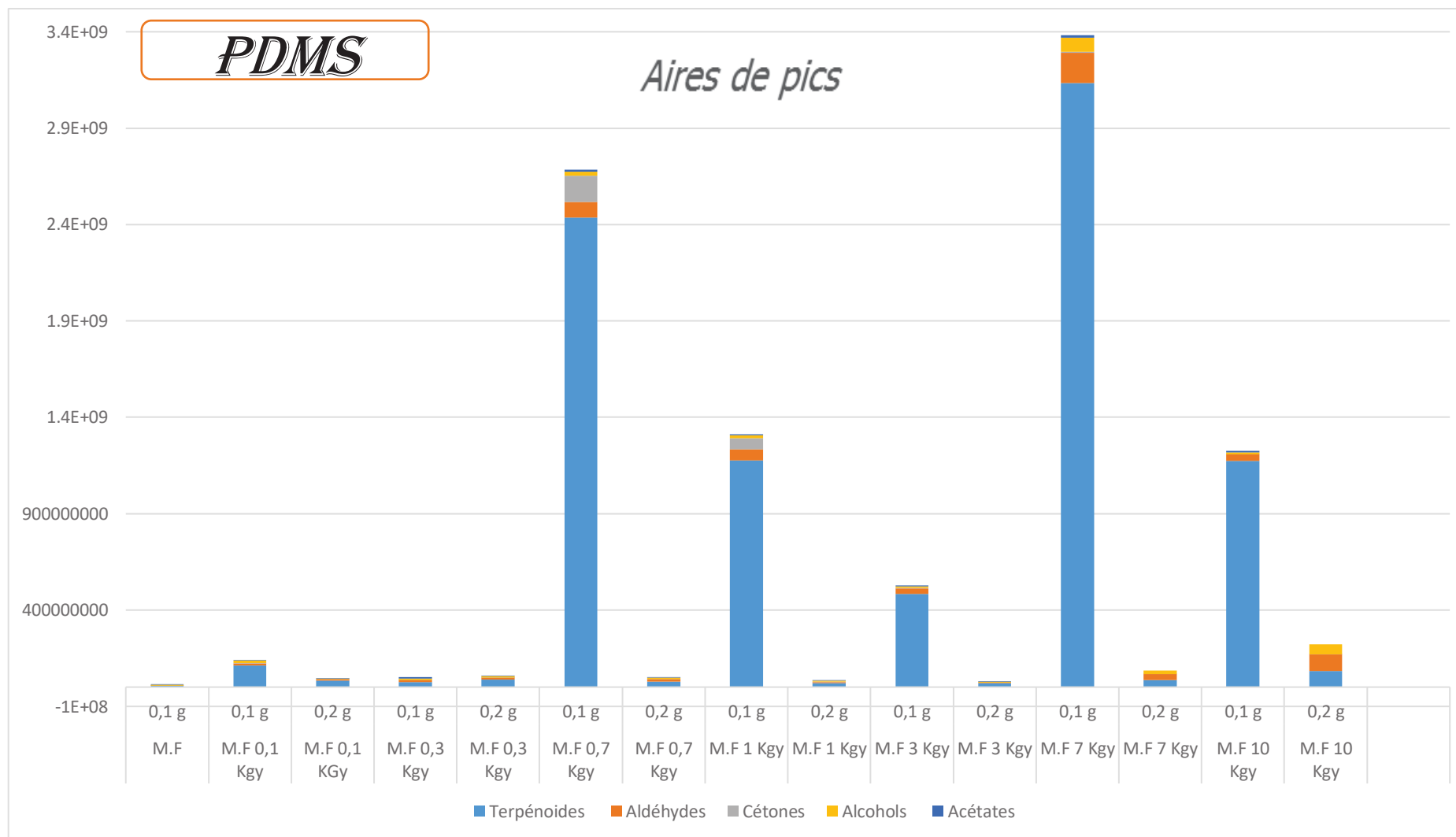


Figure 43 b : Influence de l'irradiation gamma sur les principales classes chimiques des feuilles de *T.garganica* provenant de Médéa selon la masse, analysées par la fibre PDMS

V.1.4.2. Effet de l'irradiation gamma sur les principaux composés chimiques de la volatile

Les composés chimiques caractérisant les feuilles irradiées de *T.garganica* provenant de Médéa identifiés par SPME -PDMS, sont significativement différents de ceux identifiés dans les feuilles (non traitées par rayon gamma) par la fibre PDMS/DVB (**Fig.44 a,b**); et sont présentés principalement par le **camphène** (0,6% à 0,1KGy ; 0,77% à 0,3KGy ; 31,9% à 0,7KGy ; 24,9% à 1KGy ; 18,3% à 3KGy ; 25,6% à 7KGy et atteint 24% à 10KGy du total du volatile), le **myrcène**, l'**ocimène<(E)-β>** et le **longipinène <β>** totalement absents à faibles fréquences d'irradiation et qui atteignent (21,2% à 0,7KGy ; 18,5% à 1KGy ; 13,7% à 3KGy ; 16,9% à 7KGy et 16,6% à 10KGy), (10,11% à 0,7KGy ; 9,08% à 1KGy ; 7,25% à 3KGy ; 14,85% à 7KGy et 12,92% à 10KGy) et (11,56% à 0,7KGy ; 17,35% à 1KGy ; 24,43% à 3KGy ; 13,75% à 7KGy et 16,24 à 10KGy) respectivement. Ces composés sont spécifiquement extraits à partir des feuilles de masse m=0,1 g alors qu'ils sont d'un taux minime voir nul à la masse m=0,2 g. Par contre, ces feuilles à m=0,2g, sont caractérisées par la présence des composés préalablement identifiés dans les échantillons de *Thapsia* non traités par rayons gamma : norbornène <S-méthylène-2->, verbénène, anéthole <(E)->, sabina kétone <dehydro-> et biotone B (**Fig.44b**).

Ces résultats reflètent l'effet de l'irradiation gamma et de la masse sur la composition chimique des feuilles de *T.garganica* provenant de Médéa, et permettent de conclure que la différence des taux des classes chimiques est liée aux teneurs des principaux composés chimiques qui peuvent être identifiés et constituant chaque classe. Ce qui explique les taux élevés en terpénoïdes identifiés chez les feuilles de *T.garganica* à m=0,1 g.

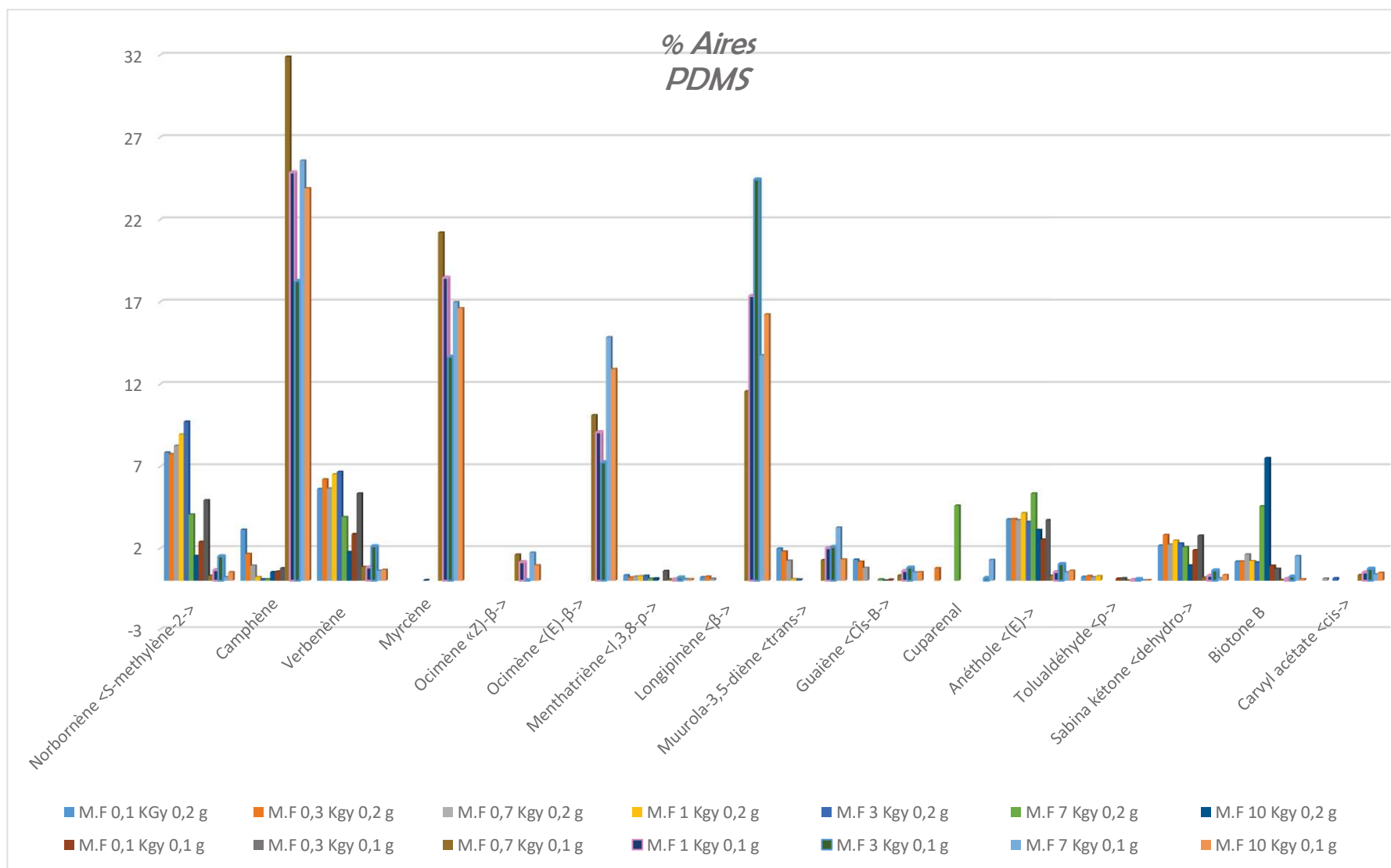


Figure 44 a : Influence de l'irradiation gamma sur le profil quantitatif des principaux composés extraits à partir des feuilles de *T.garganica* provenant de Médéa par la fibre PDMS pour différentes masses

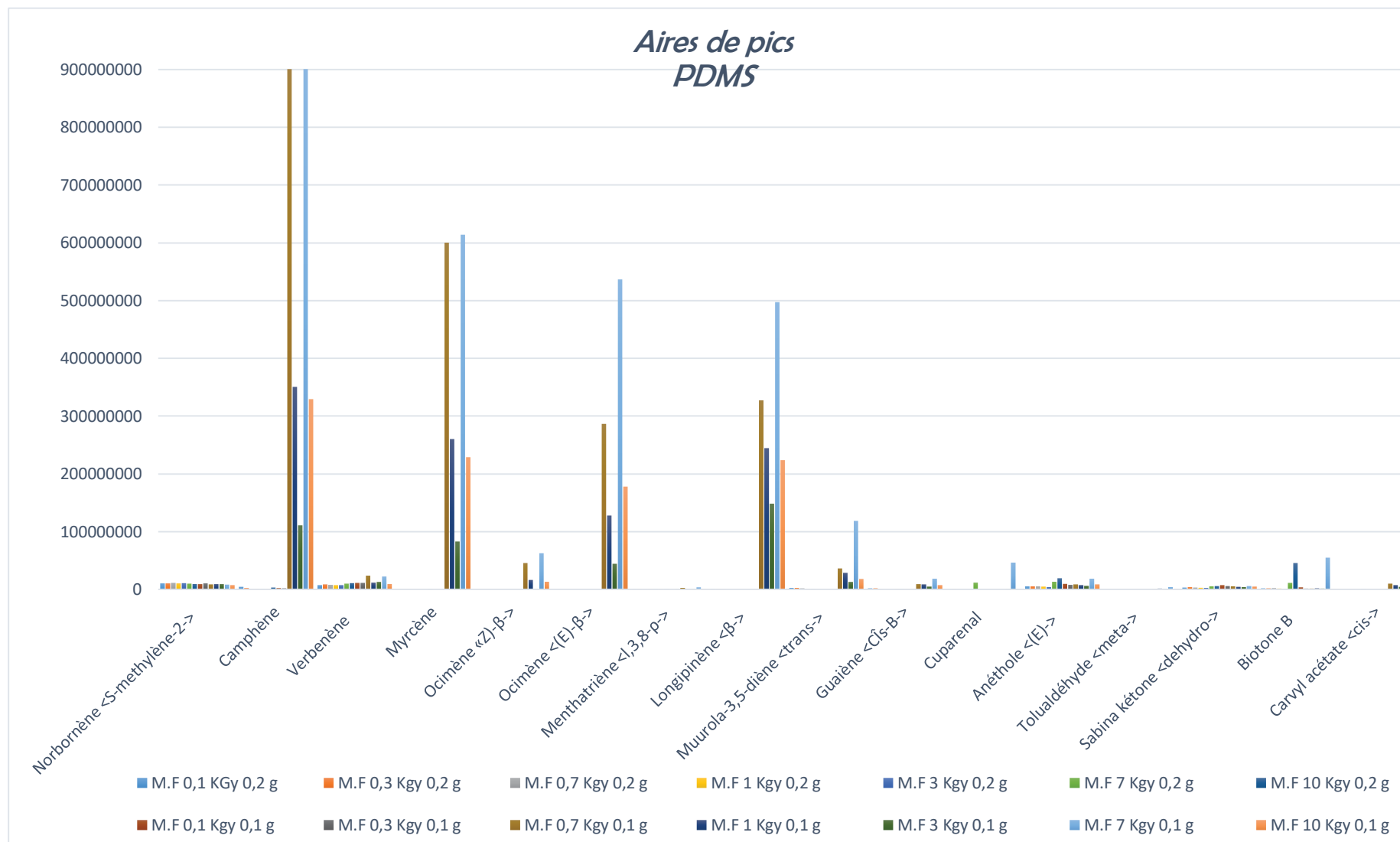


Figure 44 b : Influence de l'irradiation gamma sur les aires de pics des principaux composés extraits à partir des feuilles de *T.garganica* provenant de Médéa par la fibre PDMS pour différentes masses

V.1.4.3 Effet de l'irradiation gamma sur les classes chimiques que contient *T.garganica* originaire de Béjaia :

Par contre l'irradiation gamma n'a exercé aucun effet sur la composition chimique de la volatile des feuilles de *T.garganica* provenant de Béjaia, (**Fig.45 a,b**) et cela quel que soit la masse des échantillons traités. Au contraire on remarque une stabilité quantitative de la composition totale du volatile dont les moyennes sont de **26,3 %** (0,1 KGy, 0,05 g) ; **28,6%** (0,1 KGy, 0,1 g) ; **29 %** (0,3 KGy, 0,05 g) ; **28,4%** (0,3 KGy, 0,1 g) ; **29,92%**(0,7 KGy, 0,05 g) ; **30%** (0,7 KGy,0,1 g) ; **29,6%** (1 KGy,0,05 g) ; **28,6%** (1 KGy,0,1 g) ; **29%** (B.F. 3 KGy, 0,05 g) ; **29,5%** (B.F. 3 KGy,0,1 g) ; **29,6%** (7 KGy, 0,05 g) ; **29,8%** (7 KGy,0,1 g) ; **31,5%** (10 KGy, 0,05 g) ; **31,6%** (10 KGy, 0,1 g). Ces résultats sont en accord une autre fois avec ceux rapportés par **Seo et al., (2007)** en composants volatils de *A. gigas Nakai* Irradié et par **Yu et al., (2004)** et **Silva et al., (2008)**, aussi rapporté par **Waje et al., (2008)** qui ont confirmé la stabilité de la qualité sensorielle du poivre après irradiation. l'irradiation de ce fait pourrait être une technique fiable en terme de préservations des denrées alimentaires (**Shah et al., 2014**).

De plus, ces résultats éclairent bien l'effet de la polarité de la fibre sur l'extraction des composés chimiques. Dans notre étude, la fibre PDMS/DVB a permis une bonne extraction des différentes classes chimiques, caractérisant les extraits de feuilles de Béjaia.

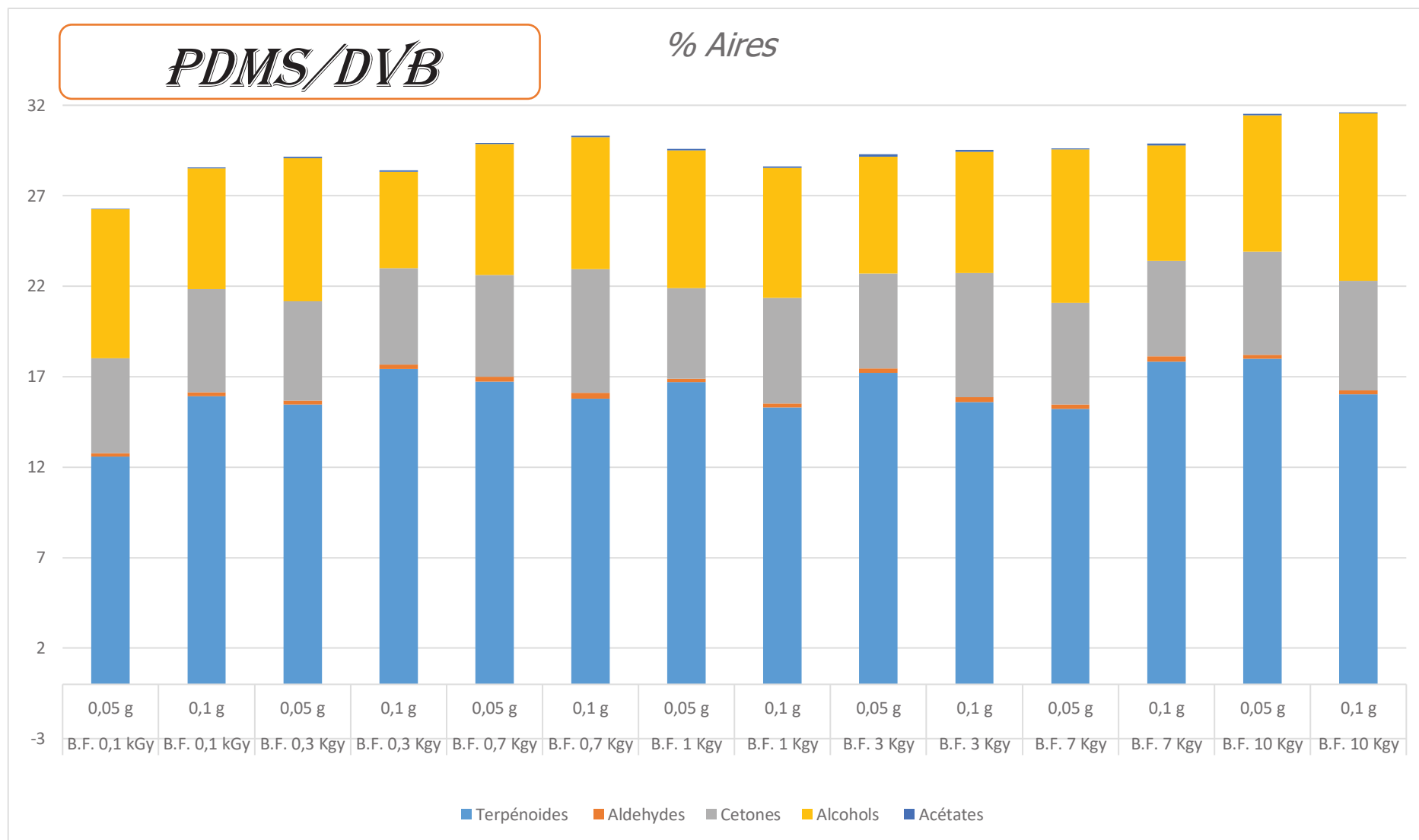


Figure 45 a : Influence de l'irradiation gamma sur les principales classes chimiques des feuilles de *T.garganica* provenant de Béjaia selon la masse, analysées par la fibre PDMS/DVB

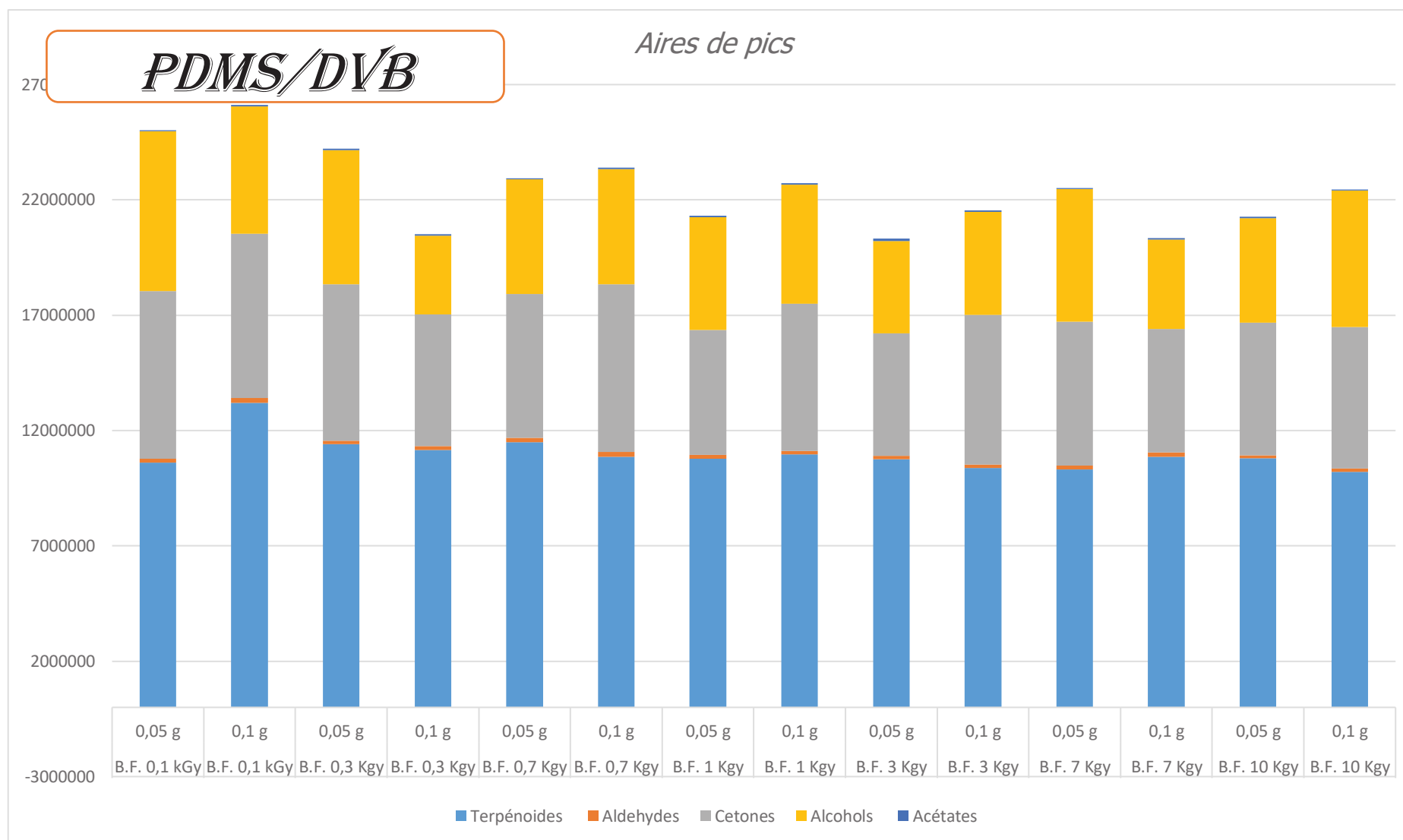


Figure 45 b : Influence de l'irradiation gamma sur les principales classes chimiques des feuilles de *T.garganica* provenant de Béjaia selon la masse, analysées par la fibre PDMS/DVB

V.1.4.4. Effet de l'irradiation gamma sur les principaux composés caractérisant ces classes chimiques que contient la plante originaire de Béjaia :

Une stabilité relative en composition est constatée en analysant les principaux constituants de la plante comme le montrent les figures dont on remarque que l'irradiation n'a pas influencé d'une manière significative l'aspect qualitatif des composés majoritaires des racines et feuilles de *Thapsia*, où les mêmes éléments chimiques trouvés au paravent dans les échantillons non traités par rayons gamma, ont été rapportés dans cette étude ; non plus leur quantité : norbornène <s-méthylène-2-> (7%), anéthole <(E)-> (6,5%), verbénène (6,5%), sabina kétone <déhydro-> (3,5%) et biotone < β -> (2,5%), en moyenne pour tous les échantillons (**Fig.46a,b**).

Quant au **germacrène B**, qui a fait une exception dans l'analyse précédente des racines de *Thapsia* de Béjaia non traitées, il a subi une stabilité quantitative dont son taux est de 0,3% du total de la volatile des feuilles irradiées, de même un taux de 0,2% enregistré pour les racines irradiées sauf à la fréquence 7KGy où sa quantité atteignait 18% du total. (**Fig.46 ; Fig.41**).

Parallèlement, une comparaison avec d'autres huiles étudiées du genre *Thapsia* a montré que les principaux composants de l'huile de fleur de *T. garganica* collectée en Sicile étaient le chamazulène (58,3%), l'oxyde d'humulène II (9,0%), le tricosane (8,2%) et le pentacosane (8,2%). tandis que, l'huile des feuilles était caractérisée par une teneur élevée en chamazulène (49,2%) suivi de 1,4-diméthylazulène (18,5%), le (E)-phytol (6,3%) et le néophytadiène (5,1%) (**Casiglia et al., 2015**).

En revanche, une étude antérieure a montré que le δ -cadinène et le β -myrcène étaient les constituants les plus importants de l'huile essentielle des racines de *T. garganica* recueillis en France et que l'huile essentielle extraite des racines contient principalement de l'élémicine (54 à 73 %) et de la latifolone (20 à 32 %) (**Avato et Rosito, 2002**). Tandis que les travaux de Drew ont montré que les racines contiennent principalement les constituants volatils suivants : les lactones sesquiterpènes, δ -cadinène, α - et δ -guaïène, élémol et guaïol (champacol), dont la thapsigargine (**Drew et al., 2012**).

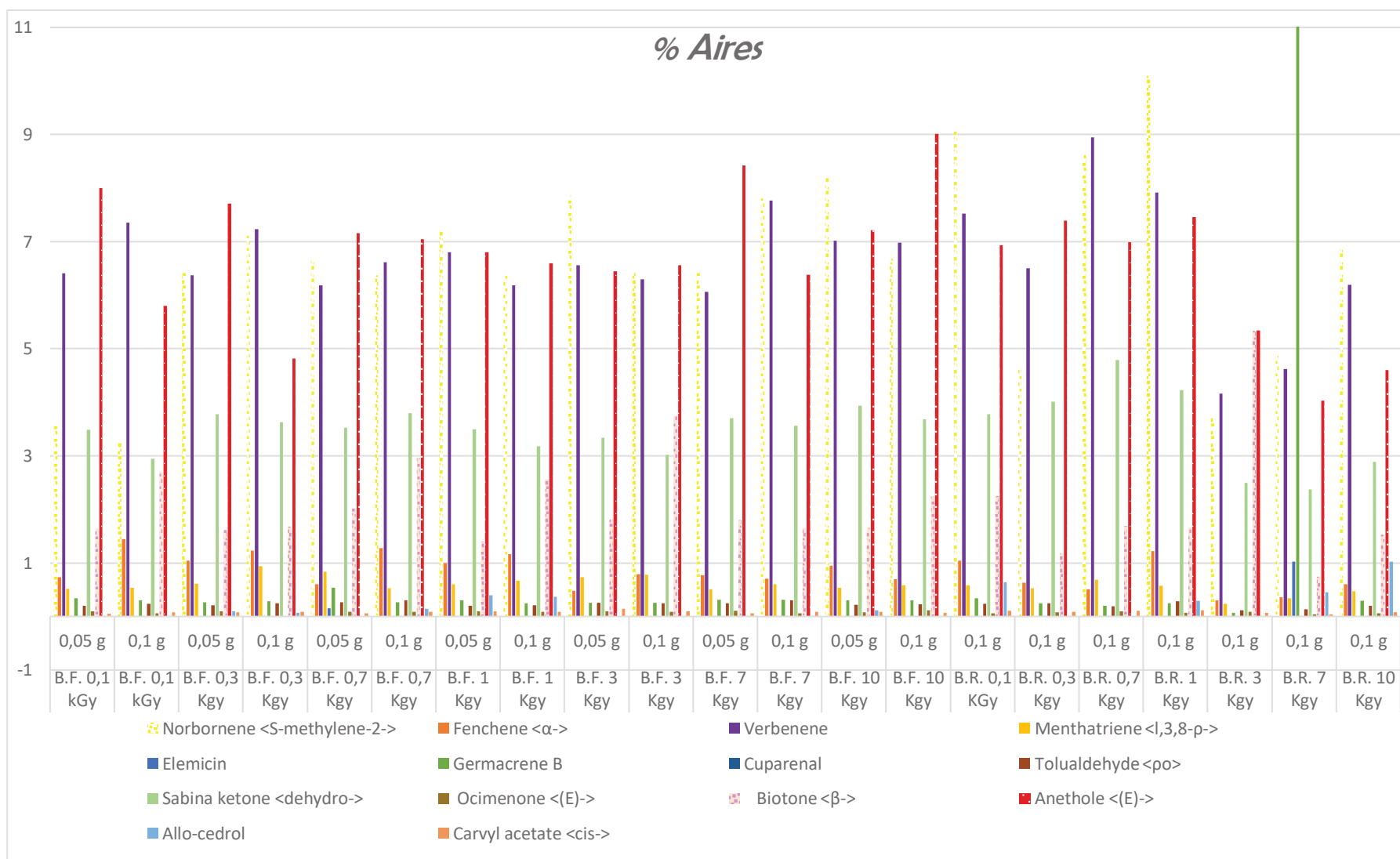


Figure 46 a : Influence des irradiations gamma sur le profil quantitatif des principaux composés extraits à partir des feuilles et racines de *T. garganica* de la région de Béjaïa par PDMS/DVB selon la masse et le diamètre des particules

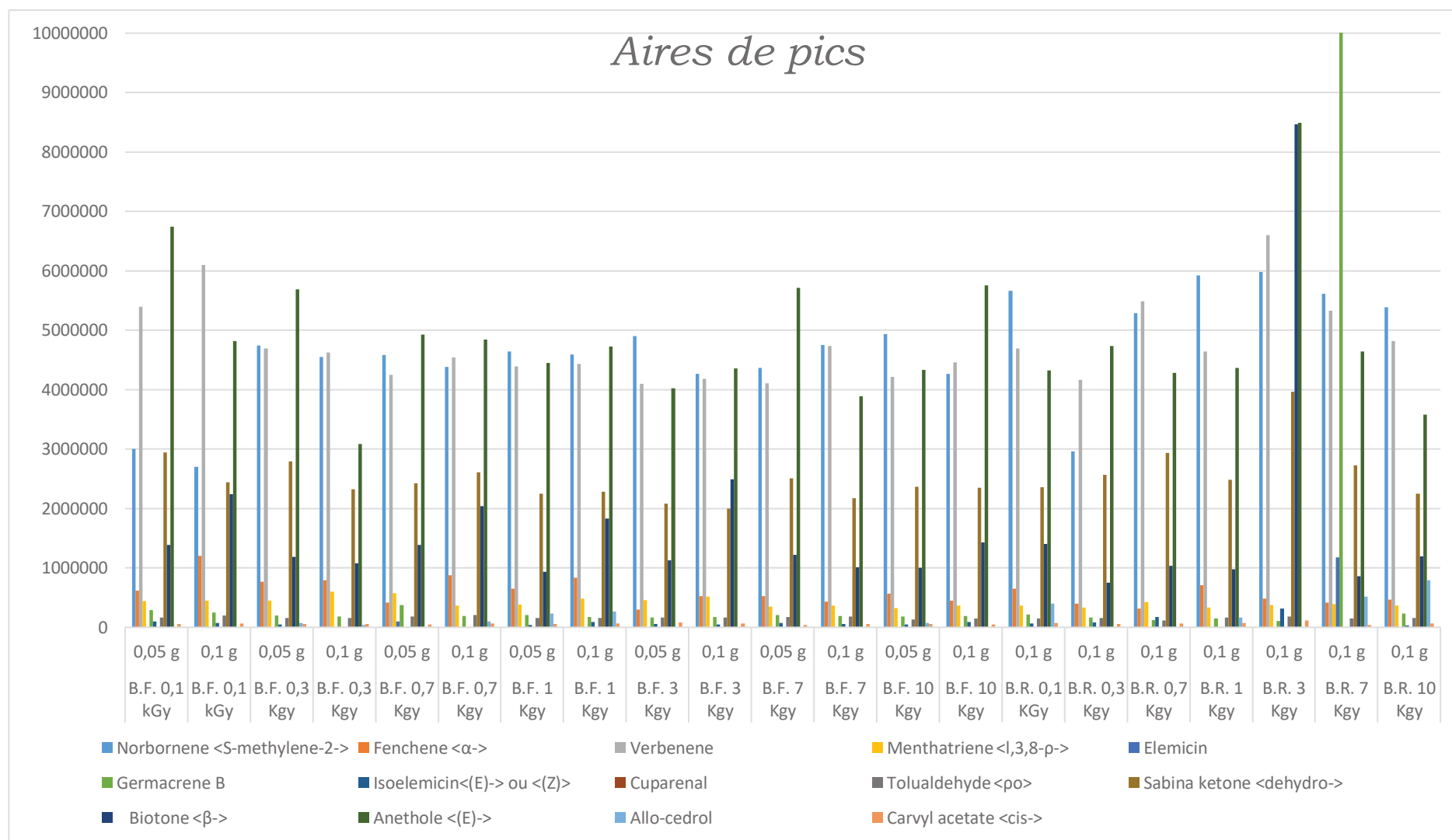


Figure 46 b : Influence des irradiations gamma sur les aires de pics des principaux composés extraits à partir des feuilles et racines de *T. garganica* de la région de Béjaïa par PDMS/DVB selon la masse et le diamètre des particules

V.1.4.5. Influence du type de la fibre d'analyse HS-SPME sur l'aspect qualitatif et quantitatif des classes chimiques extraites et identifiées partir des plantes irradiées :

Concernant l'effet de la fibre sur l'aire globale des pics (des chromatogrammes), on constate clairement l'efficacité de la PDMS comparée à la PDMS-DVB dans le cas des racines de *T.garganica* originaire de Médéa (Figure 47) ceci est essentiellement dû à la polarité des constituants.

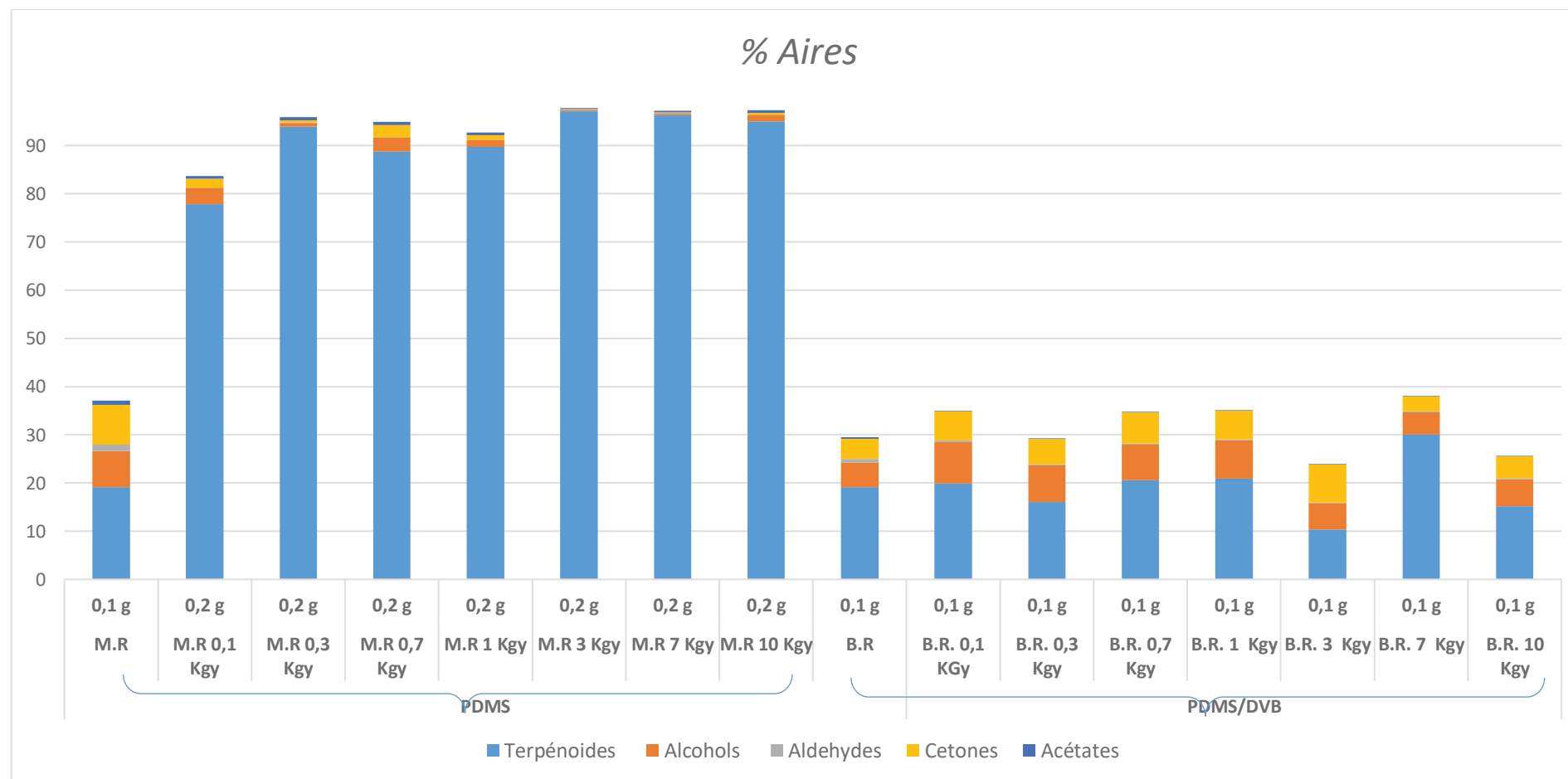


Figure 47 : Influence de l'irradiation gamma et de la fibre sur le profil chimique des racines de *T.garganica* de la région de Médéa et de Béjaia

Conclusion :

En général, les profils de volatiles isolés des deux organes après irradiation gamma n'ont pas révélé une différence qualitative et quantitative frappante.

D'un point de vue compositionnel, les résultats actuels diffèrent significativement de ceux précédemment rapportés pour les espèces de *Thapsia* (**Tableau 11a,b**). Comme on peut le voir, la composition chimique des volatiles isolés de l'espèce *Thapsia* était quelque peu variable selon les organes, l'origine végétale et la procédure d'analyse.

D'autre part, la comparaison de nos données avec des études publiées a clairement montré l'existence de différents chémotypes de volatiles des espèces de *Thapsia*. Comme le montre les **tableaux 11 (a et b)** et les **figures (40 à 47)**, les profils des volatiles des échantillons étaient principalement constitués de terpènes et de leurs dérivés. Dans les profils terpéniques globaux, les hydrocarbures terpéniques (20% en moyenne) constituaient la principale classe de composés pour la plupart des échantillons, à l'exception des échantillons provenant de Béjaia finement divisés, dont une variabilité quantitative était remarquable (4%-34% d'hydrocarbures sesquiterpéniques). Dans cette classe de composés : norbornène <S-méthylène-2->, verbenène, étaient les composés les plus importants. Les monoterpènes oxygénés : <(E)->, sabina kétone <déhydro-> et biotone B ont également été des contributeurs importants à l'ensemble des feuilles et racines de *T.garganica*.

Cette composition n'a subi aucun changement qualitatif de *T.garganica* originaire de Béjaia, en utilisant la fibre PDMS/DVB, une stabilité, au contraire, et quelle que soit la masse des particules a été remarquée après traitement par rayon gamma. L'effet de la conservation des rayons gamma des différents produits a été confirmé vu la stabilité constatée du germacrène B que contiennent les racines de *Thapsia* provenant de Béjaia. En revanche, l'analyse HS-SPME-CG-MS des feuilles de *T.garganica* traitées par rayons gamma originaire de Médéa a montré que les principaux composés identifiés étaient le camphène, le myrcène, l'ocimène <(E)-β> et le longipinène <β> en utilisant la fibre PDMS, spécifiquement extraits à partir des feuilles de masse m=0,1 g, ce qui explique l'affinité de ces composés vis-à-vis de la polarité de la fibre.

Globalement, aucune relation significative n'a été trouvée entre la composition en volatile et la distribution géographique des populations étudiées. En effet, les plantes récoltées à Béjaia et à Médéa, avaient des huiles volatiles avec un profil chimique qualitativement similaire.

On peut supposer que peu importe l'emplacement géographique de l'habitat, la variation de la composition du volatile peut être due en grande partie aux différences dans le patrimoine

génétique qui déterminent l'expression de différentes voies métaboliques. Ce qui a été rapporté dans les études d'**Avato et al. (2002)**. Il a été clairement démontré que le profil chimique des échantillons de *T.garganica* est étroitement lié à la contenance de cette dernière en composés dits majoritaires.

D'autres analyses génétiques sont nécessaires pour élucider la base génétique du polymorphisme chimique parmi les populations de *T. garganica*. De même, il est nécessaire d'étudier d'une manière plus approfondie l'influence des rayonnements gamma qui est un procédé de conservation, sur les composés de cette plante.

Chapitre 2 : Illustration des différents résultats des analyses testées dans la deuxième partie de l'étude

Analyse HS-SPME-CG-MS des fruits de *T.garganica*

I. Effet de la masse et de la taille des particules sur la composition chimique de la volatile de *Thapsia garganica*

Au total, 124 composés ont été identifiés par HS-SPME à partir du fruit de *T. garganica* pour différentes masses m (g) ; (A: 96,58%, $m=0,02$ g ; B: 89,61%, $m=0,05$ g et C: 94,21%, $m=0,1$ g) avec broyage cryogénique moyen de 250 μm (BCRM:) (**Tableau 12, Annexe 2**), le broyage finement divisé cryogénique BCRFD ($dp=85$ μm) a fourni un taux en moyenne de (D: 97,49% pour $m=0,02$ g et E: 93,67% pour $m=0,05$ g), tandis que le pourcentage est de (F: 82,68 % à une masse $m=0,02$ g) et (G: 90,238%, $m= 0,02$ g) avec le broyage classique BCL à 250 μm de diamètre de particule moyen (**Fig.48**).

Selon la **figure 48** , correspondant aux aires totaux des pics, nous avons noté que les principaux composés sont mieux extraits par broyage cryogénique (D) comparé au broyage classique (F) pour la même masse $m = 0,02$ g.

La surface de pic totale des particules finement divisées (FD) à 85 μm (D et E) était inférieure à celle des particules de 250 μm de diamètre (A, B et C) pour la même masse. Les rapports des aires de pic α (B / E pour $m = 0,05$ g) et (A / D pour $m = 0,02$ g) étaient respectivement de 1,77 et 4,06, ce qui montre un effet simultané de la taille des particules et de la masse de l'échantillon utilisé.

Cette diminution du rendement est probablement attribuée au colmatage des particules fines empêchant un bon transfert de masse dans l'échantillon utilisé. Ainsi, une grande quantité d'extrait volatile est piégée dans l'échantillon, provoquant une forte diminution de la quantité retenue par la fibre. En effet, une réduction des dimensions des particules devrait normalement augmenter les aires de pic totales et permettre plus l'extraction de composants volatils à partir de sites exogènes que ceux des sites endogènes des particules broyées.

D'autre part, nous avons noté une fluctuation dans les aires de pic totales selon la masse de l'échantillon utilisé pour la taille de particule étudiée dp : 85 et 250 μm (**Fig.48**). Globalement, la masse optimale enregistrée correspond à la plus grande quantité d'échantillon, 0,1 g et 0,05 g pour $dp_1=250$ μm et $dp_2=85$ μm respectivement.

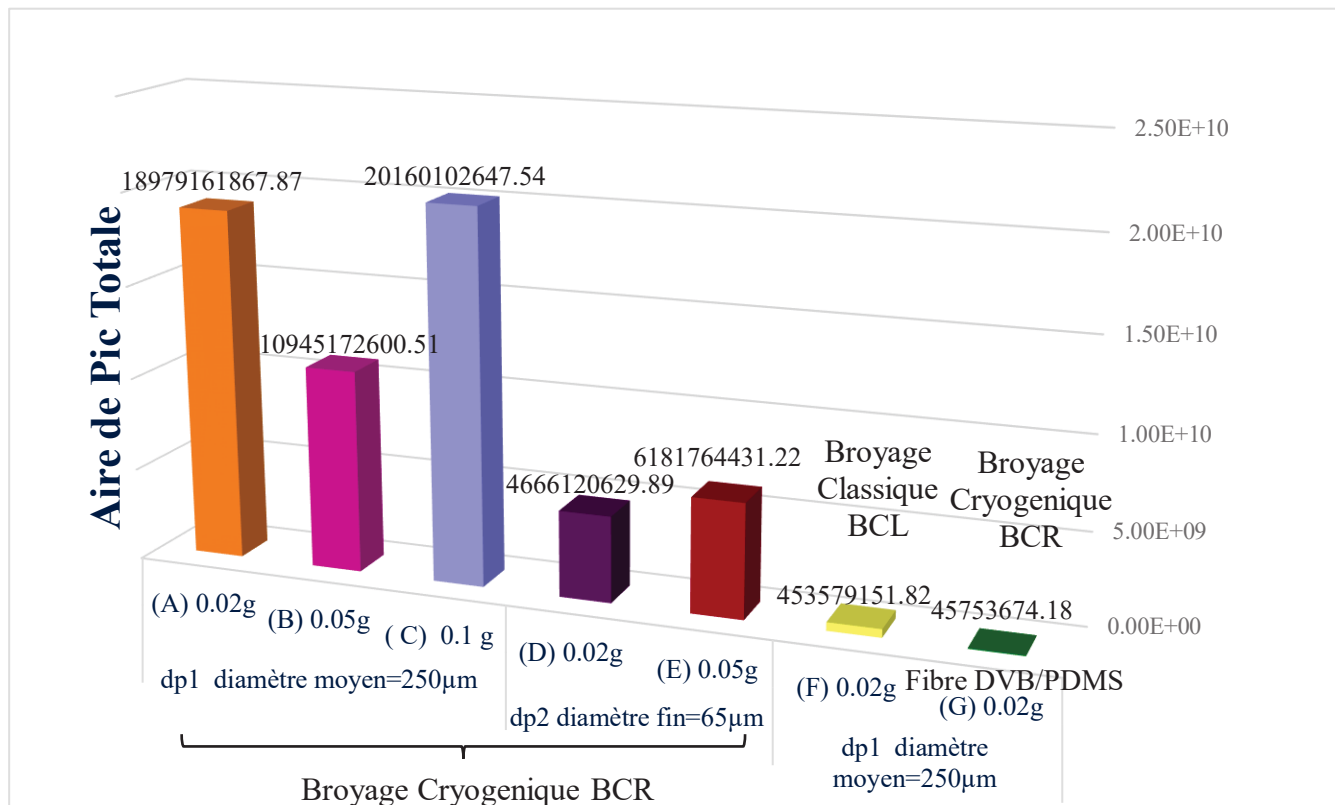


Figure 48 : Aires de pics totales détectées par l'extraction SPME à partir de fruits de *T.garganica* L. selon les différents paramètres variables.

Pour les fruits ($m = 0,05$ g), l'extraction des hydrocarbures terpéniques, des alcools, des cétones et des aldéhydes de sesquiterpène était élevée avec $dp1 = 250 \mu\text{m}$, à l'exception des hydrocarbures monoterpènes et des éthers ; Ces classes chimiques ont été moins extraites et isolées pour les échantillons FDCR ($dp2 = 85 \mu\text{m}$) (Fig.48).

D'autre part, selon le tableau 12, nous avons observé un profil curviligne pour toutes les classes chimiques, présentant un maximum pour les échantillons modérément broyés à $m=0,05$ g, à l'inverse des hydrocarbures monoterpéniques, un profil curviligne avec un minimum est observé pour la même masse (54,4 à 82,14% correspondant à B et C respectivement), les hydrocarbures sesquiterpéniques (9,26 à 23,5% correspondant respectivement à C et B), suivis par les composés oxygénés (2,27 à 11,7% correspondant respectivement à A et B).

Tableau 12 : Pourcentage total de surface des pics des composés extraits de *T.garganica L.*

Type de fibre	% Aire de pics						
	Fibre PDMS					Fibre polaire PDMS/DVB	
	Broyage Cryogénique					Broyage Classique	Broyage Cryogénique
Classes chimiques	dp1 moyennement divisés =250µm			dp2 finement divisés = 85µm		dp1 moyennement divisés =250µm	
Echantillons de Fruit	(A) 0,02g	(B) 0,05g	(C) 0,1 g	(D) 0,02g	(E) 0,05g	(F) 0,02g	(G) 0,02g
Monoterpène h.c	81,42	54,4	82,14	82,79	75,7	41,61	70,09
Sesquiterpène h.c	12,88	23,5	9,26	13,18	9,16	36,61	15,69
Composés oxygénés	2,27	11,67	2,81	1,52	8,81	4,46	4,46
Alcools	0,73	1,22	0,69	0,90	0,53	1,6	2,1
Cétones	0,38	2,88	1,41	0,2	0,18	1,56	0,73
Ethères	0,97	1,19	0,49	0,21	0,33	0,62	1,07
Aldéhydes	0,19	6,38	0,22	0,21	7,77	0,68	0,56
% Total des Composés	<u>96,6</u>	<u>90</u>	<u>94</u>	<u>97</u>	<u>94</u>	<u>83</u>	<u>90,24</u>

Dans le cas des échantillons FDCG finement divisés = 85 µm, certaines classes montrent un pourcentage croissant en composés oxygénés, en particulier les aldéhydes et les esters, tandis que d'autres classes oxygénées comme les cétones et alcools diminuent. De plus, les hydrocarbures monoterpéniques ainsi que les hydrocarbures de sesquiterpène ont été mieux extraits avec une masse inférieure (0,05 g).

Tous ces résultats montrent que certains paramètres tels que la masse de l'échantillon, le mode de broyage, la taille des particules et en particulier le type de fibre utilisée influent de manière significative sur la composition qualitative et quantitative de la matrice analysée.

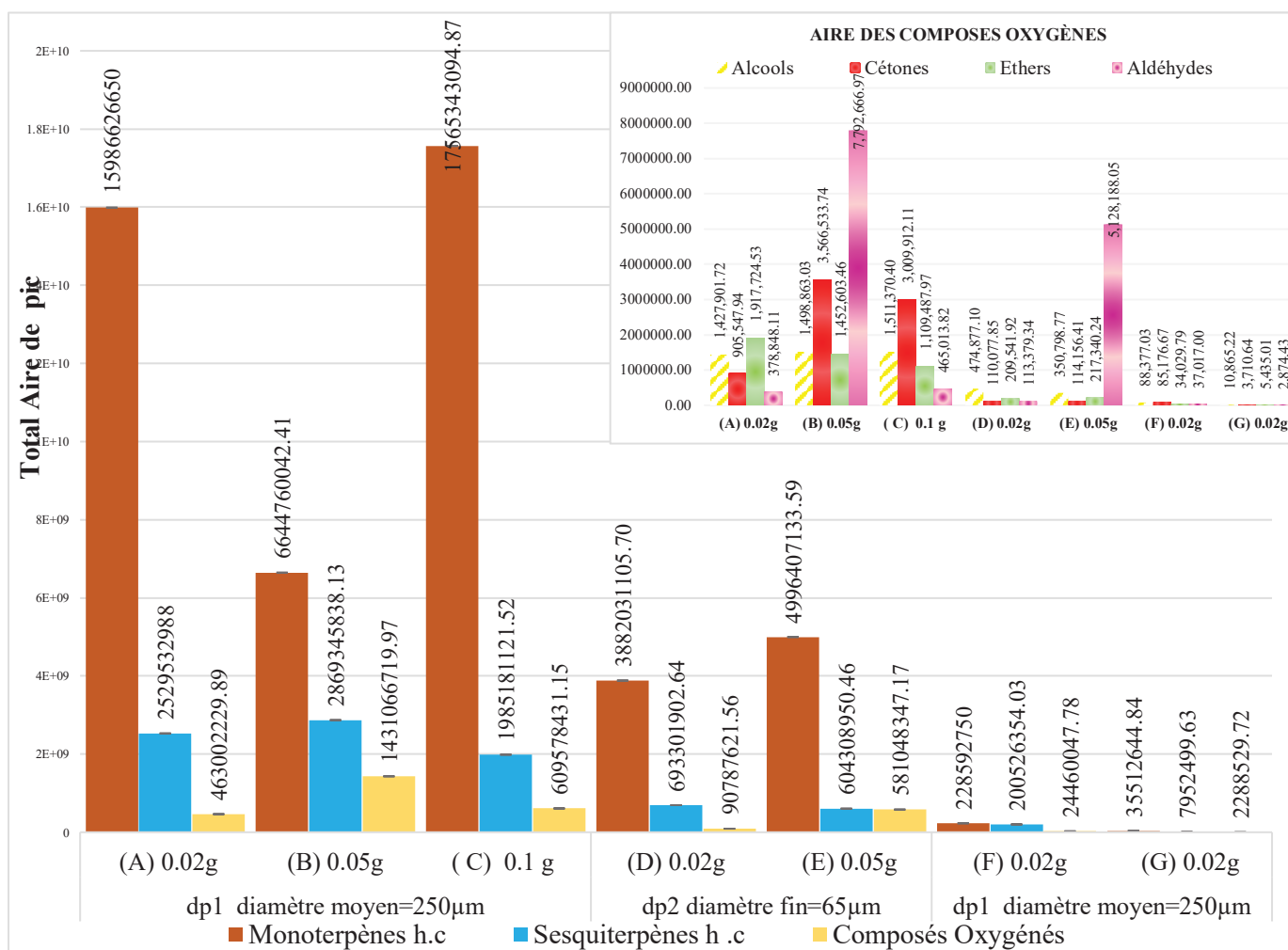


Figure 49 : Variation des aires de pics des différentes classes chimiques de l'huile volatile de *T.garganica L.*

Du point de vue de l'affinité des composés extraits vis-à-vis de la fibre, la **figure 49** montre des surfaces de pic relativement variables, l'effet de la masse d'échantillon est plus significatif pour les monoterpènes et les composés oxygénés pour les échantillons MD (A, B, C) et FD (D, E). Bien que l'on observe une faible fluctuation pour les sesquiterpènes h.c A, B et C, ainsi que D et E. Ainsi, les aires de pic les plus importantes ont été enregistrées avec une masse élevée (0,1 et 0,05 g pour les échantillons MD et FD).

Alors que l'extraction de composés chimiques était globalement plus importante pour une taille de particule de 250 µm, en revanche, les monoterpènes et les aldéhydes étaient plus ou moins extraits avec la deuxième taille de particule (85 µm). Sur la base des faits ci-dessus, la taille des particules de 250 µm a été adoptée à cette fin (**Fig.49**).

Les profils chimiques de la volatile de chaque échantillon révèlent tous ces résultats et détaillent pour chacun, les différents composés extraits avec leurs temps de rétention bien définis et sont représentés par les chromatogrammes figurant sur les **figures de 50 à 56**.

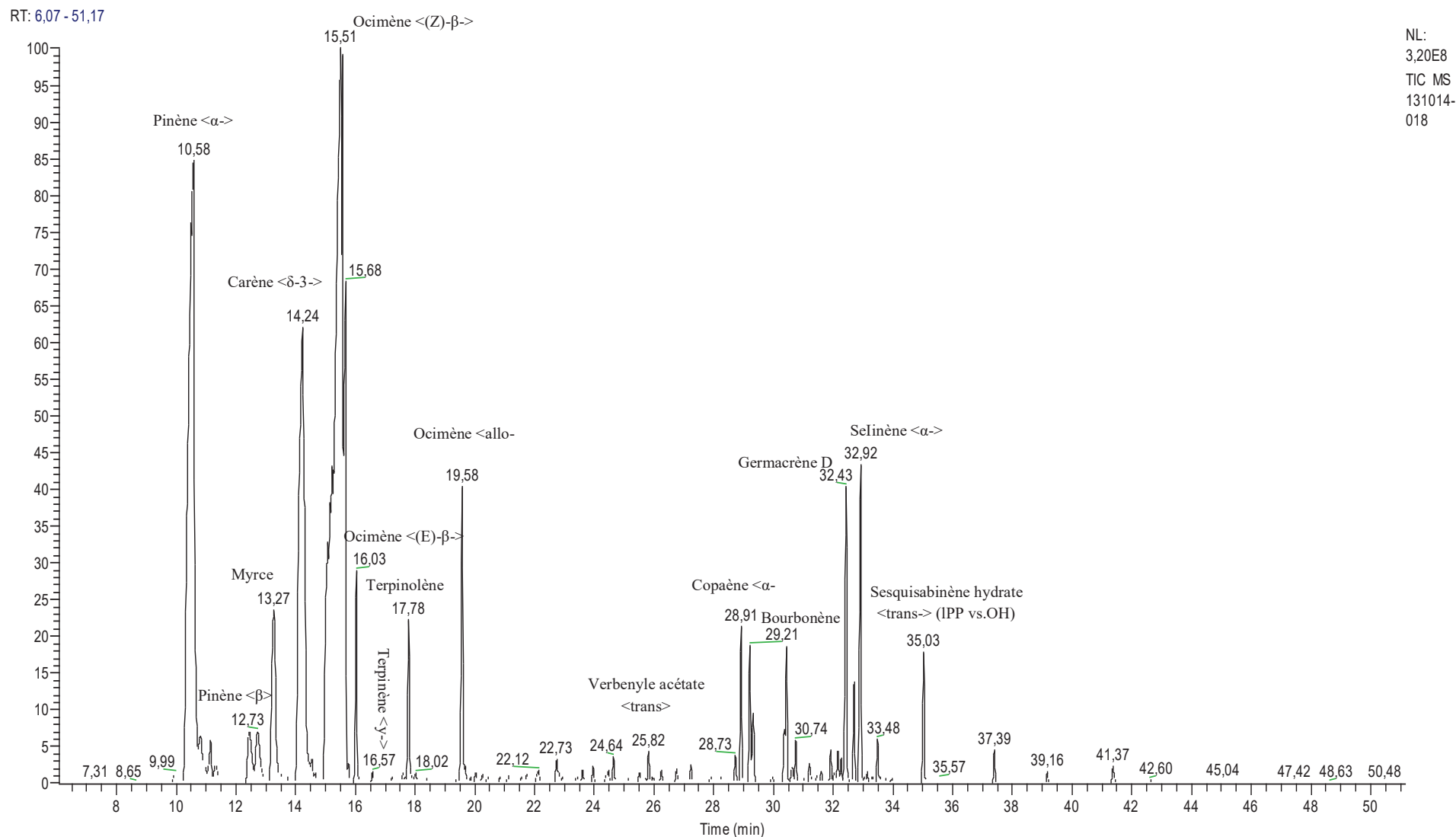


Figure 50 : Chromatogramme GC-MS (colonne HP5-MS) de la volatile de la graine de extraite par HS-SPME avec une fibre PDMS (100 µm) masse de 0,05 g et un diamètre de particule moyen $dp = 250\mu m$ (Broyage cryogénique). Echantillon A.

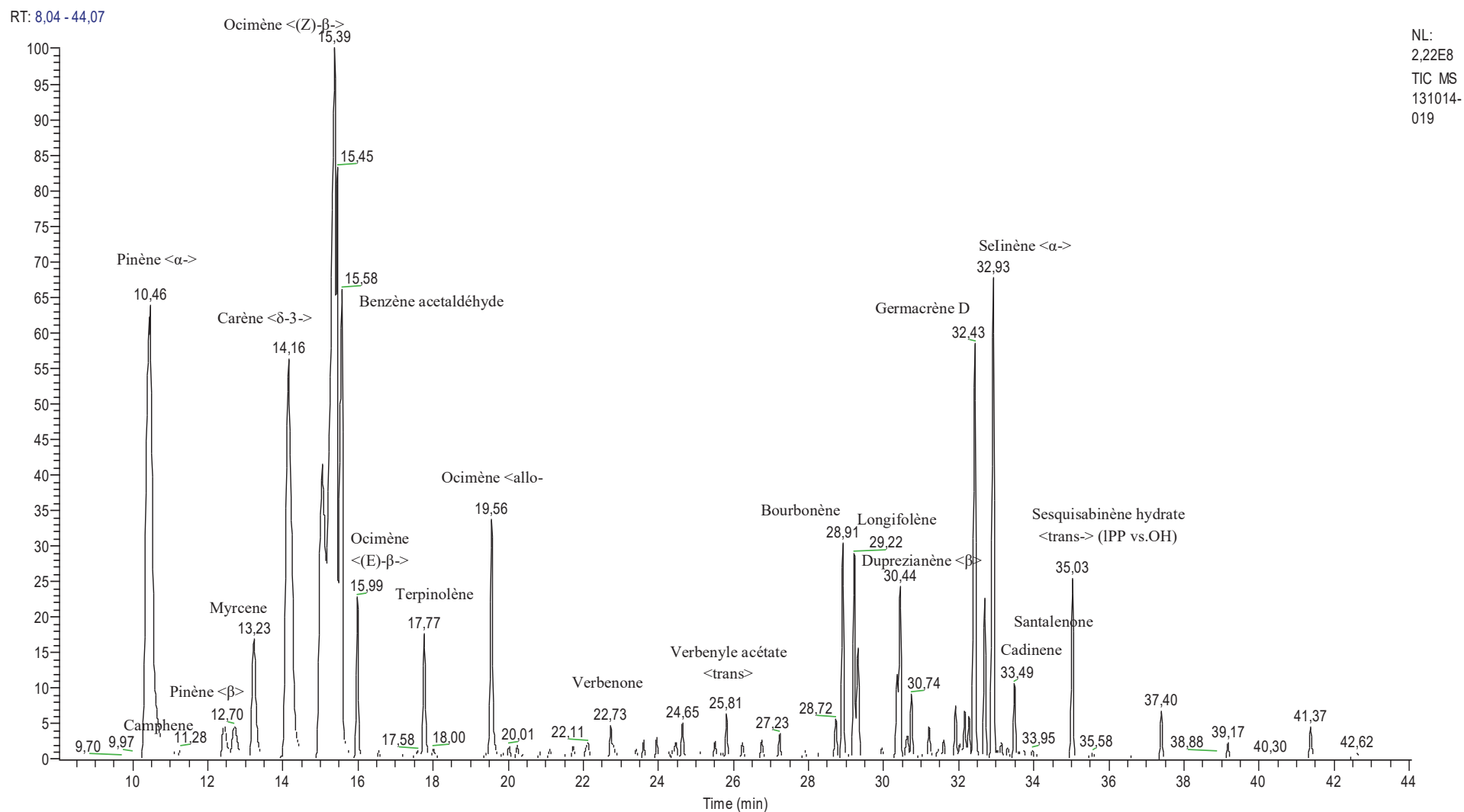


Figure 51 : Chromatogramme GC-MS (colonne HP5-MS) de la volatile de la graine de *Thapsia garganica* extraite par HS-SPME avec une fibre PDMS (100 μm) masse de 0,02 g et un diamètre de particule moyen $\text{dp} = 250\mu\text{m}$ (Broyage cryogénique). Echantillon B.

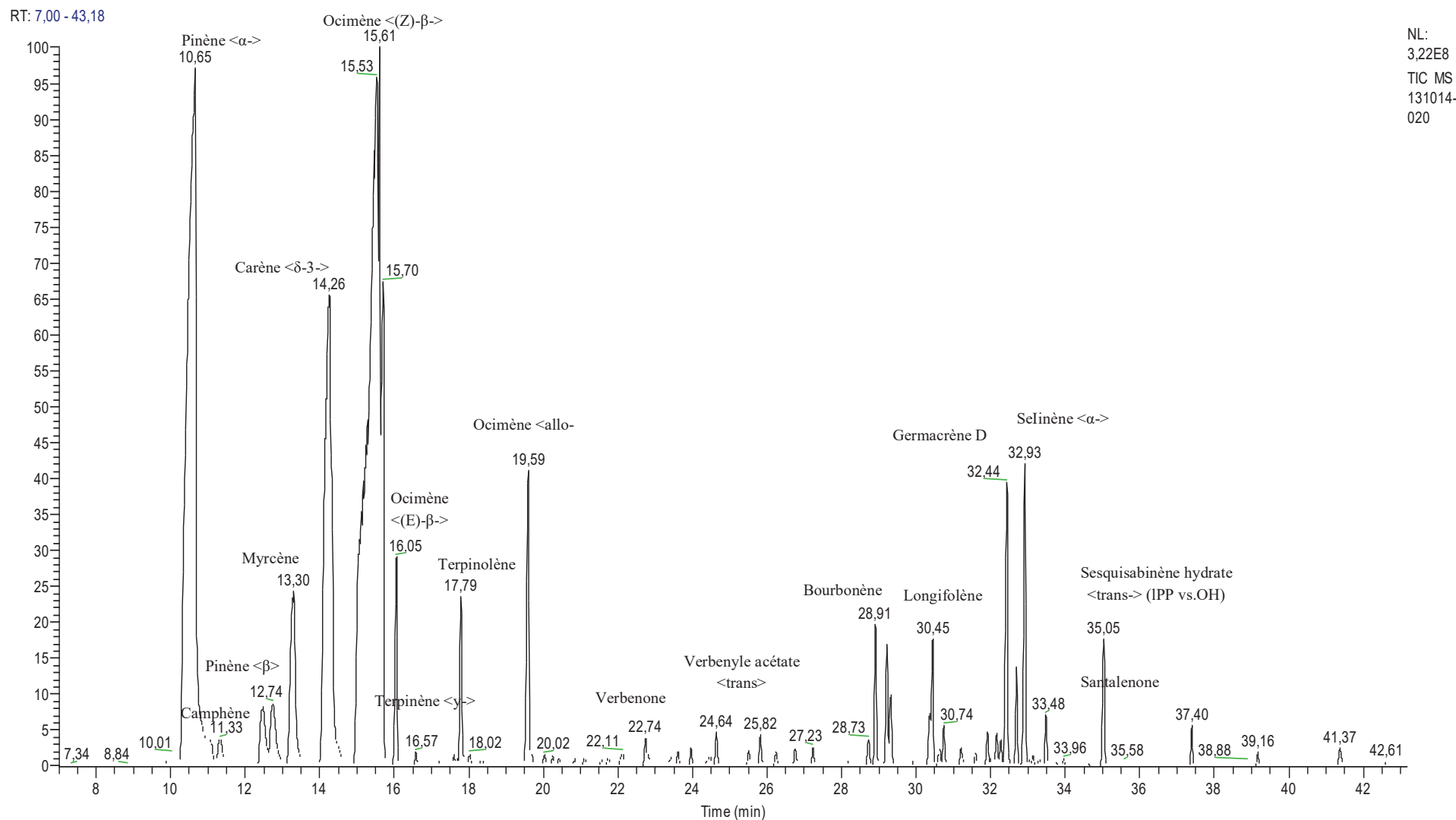


Figure 52 : Chromatogramme GC-MS (colonne HP5-MS) de la volatile de la graine de *Thapsia garganica* extraite par HS-SPME avec une fibre PDMS (100 μm) masse de 0,1 g et un diamètre de particule moyen $\text{dp} = 250\mu\text{m}$ (Broyage cryogénique). Echantillon C.

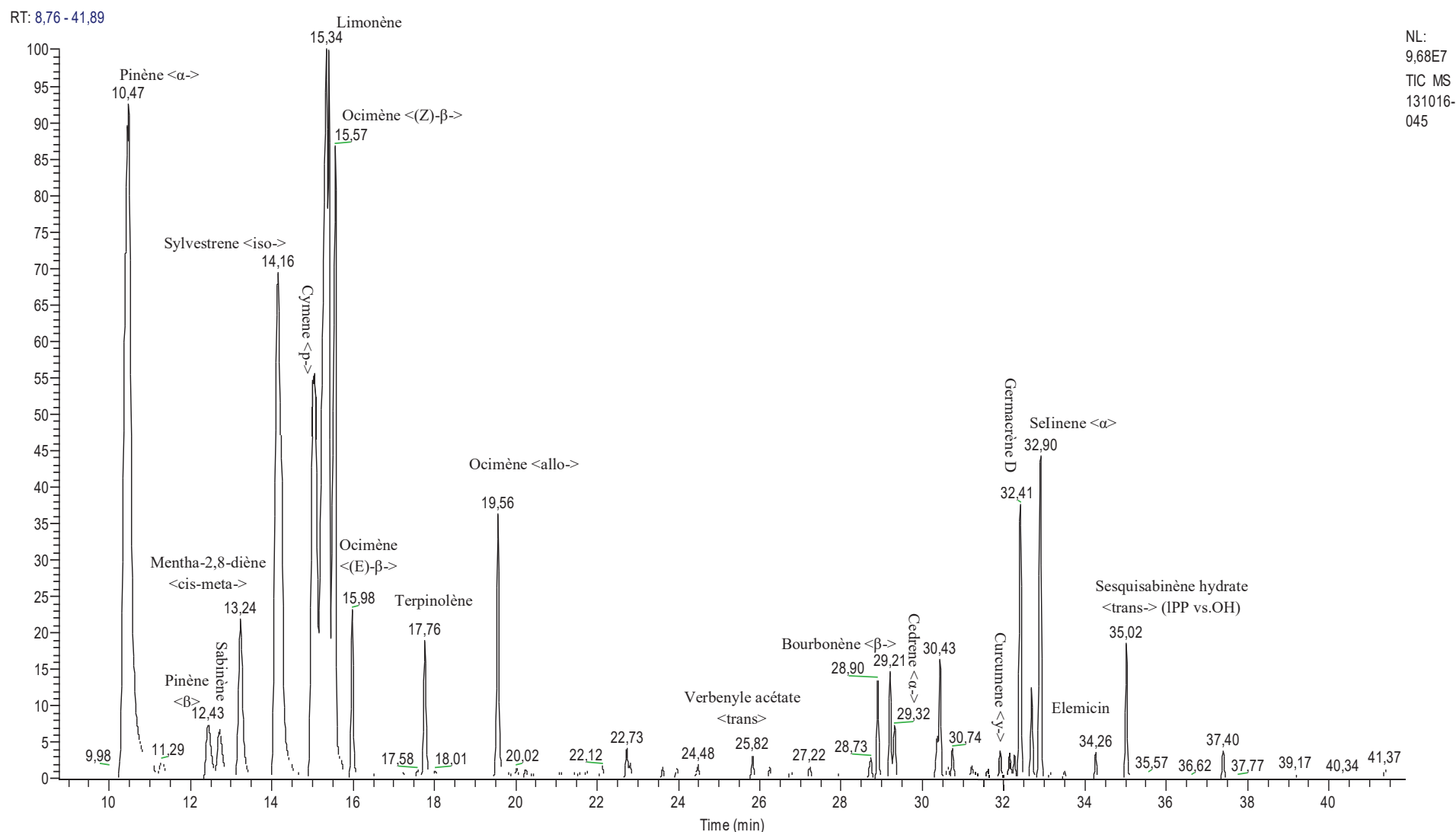


Figure 53 : Chromatogramme GC-MS (colonne HP5-MS) de la volatile de la graine de *Thapsia garganica* extraite par HS-SPME avec une fibre PDMS (100 μm) masse de 0,02 g et un diamètre de particule moyen $\text{dp} = 85\mu\text{m}$ (Broyage cryogénique). Echantillon D.

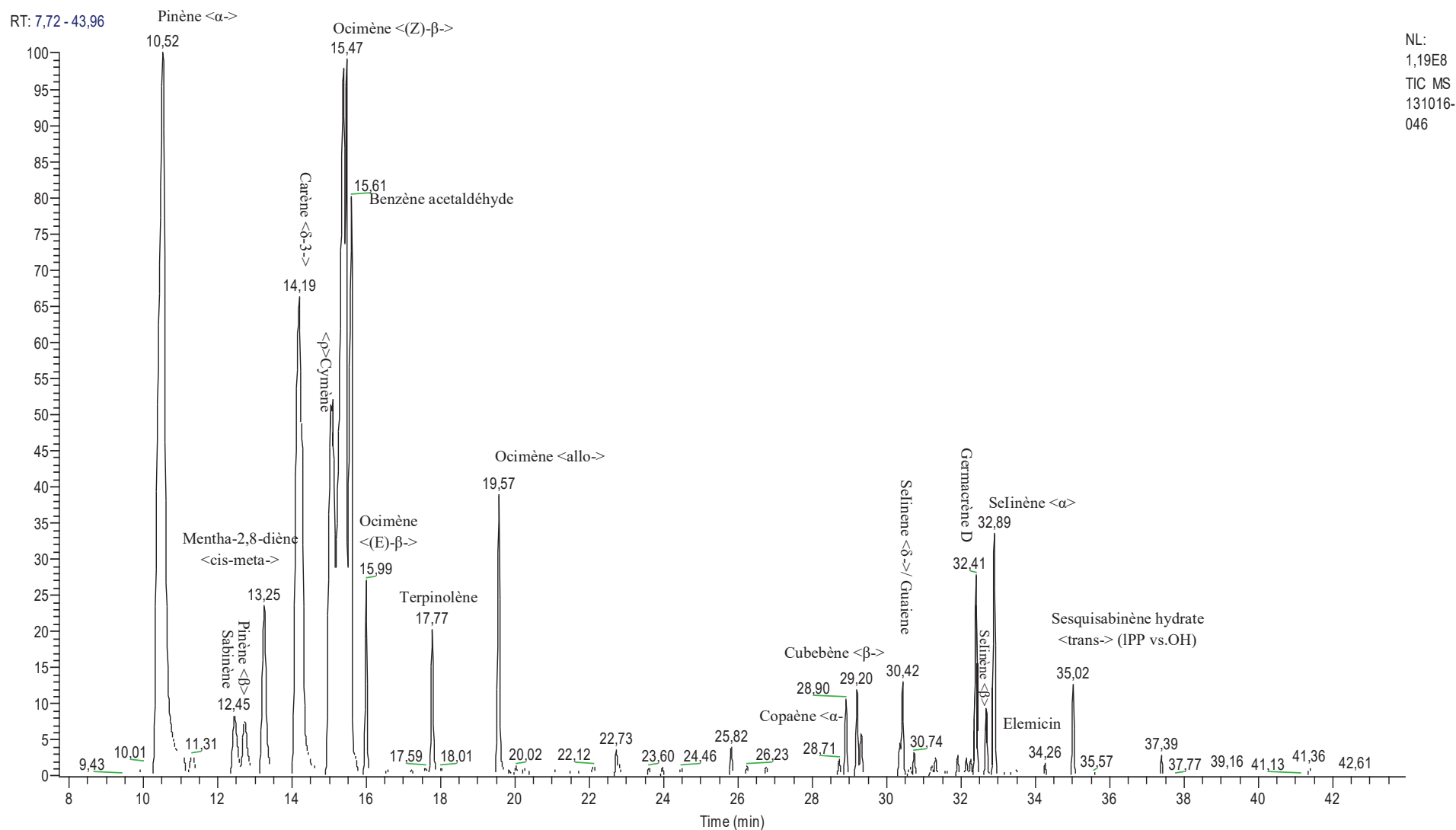
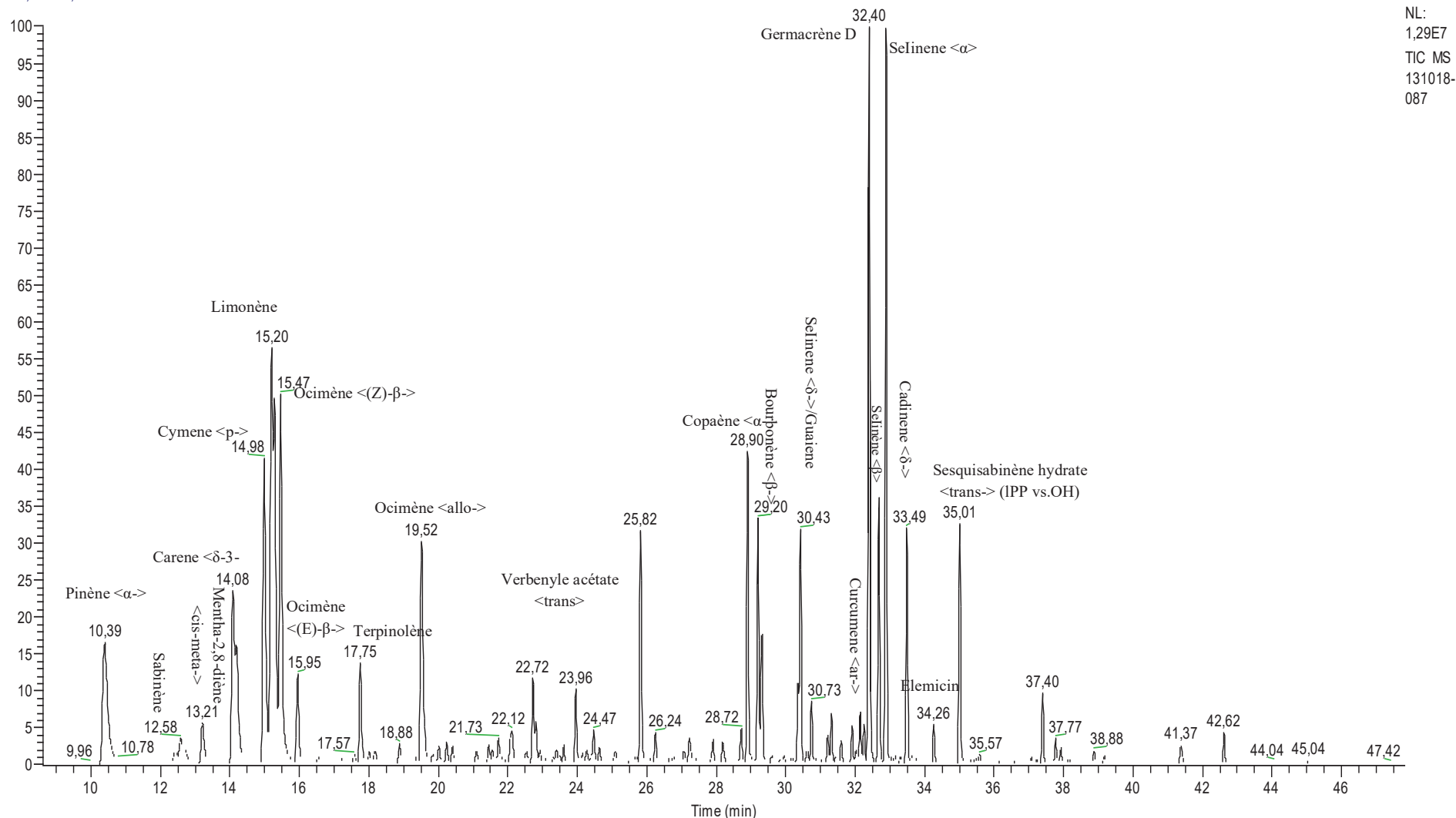


Figure 54 : Chromatogramme GC-MS (colonne HP5-MS) de la volatile de la graine de *Thapsia garganica* extraite par HS-SPME avec une fibre PDMS (100 μm) masse de 0,05 g et un diamètre de particule moyen $d_p = 85\mu\text{m}$ (Broyage cryogénique). Echantillon E.

RT: 8,60 - 47,83



NL:
1,29E7
TIC MS
131018-
087

Figure 55 : Chromatogramme GC-MS (colonne HP5-MS) de la volatilité de la graine de *Thapsia garganica* extraite par HS-SPME avec une fibre PDMS (100 μm) masse de 0,02 g et un diamètre de particule moyen $\text{dp} = 250\mu\text{m}$ (Broyage classique). Echantillon F.

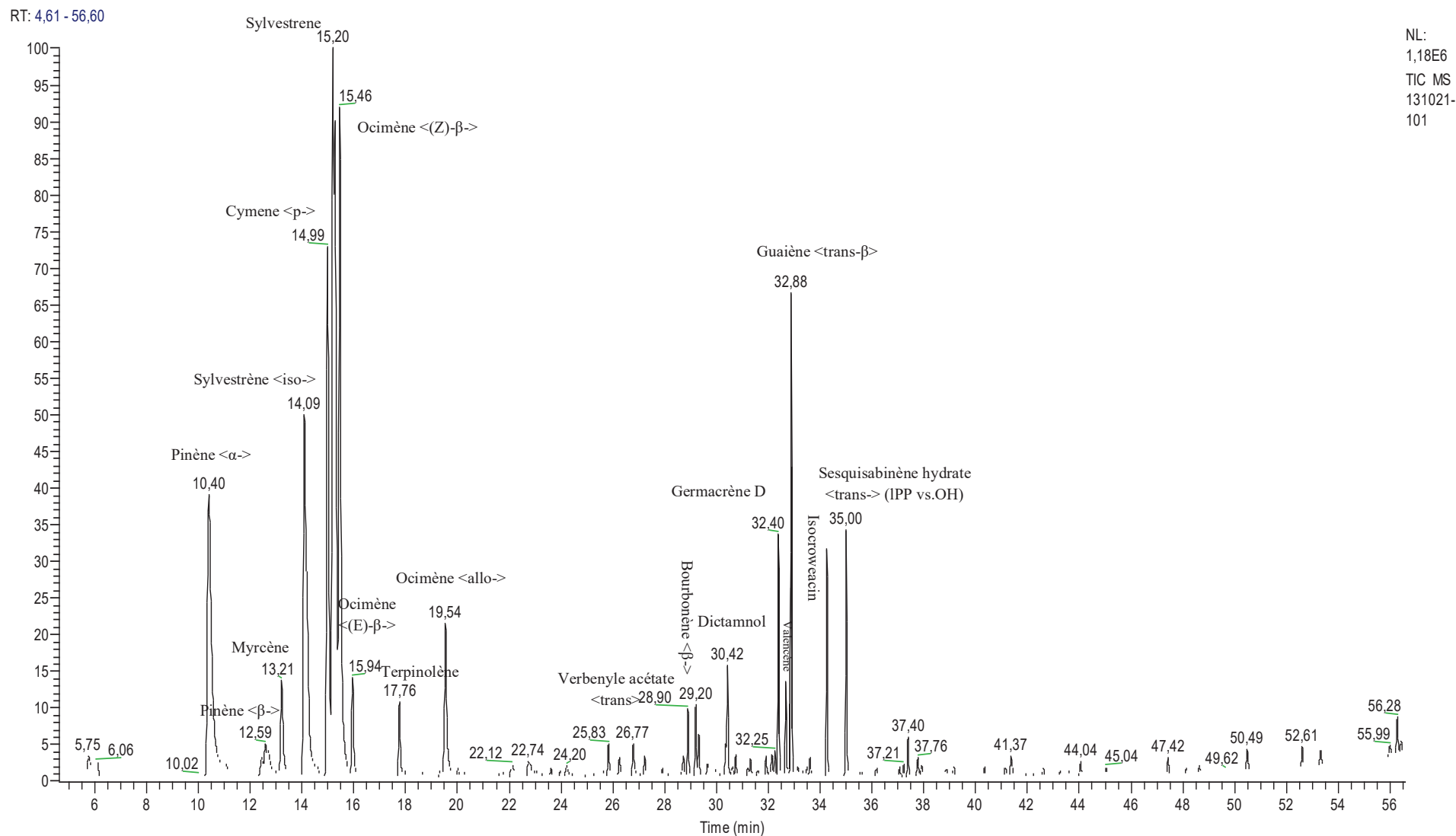


Figure 56 : Chromatogramme GC-MS (colonne HP5-MS) de la volatilité de la graine de *Thapsia garganica* extraite par HS-SPME avec une fibre PDMS-DVB (85 µm) masse de 0,02 g et un diamètre de particule moyen dp = 250µm (Broyage cryogénique). Echantillon G.

Dans notre cas, les composés les plus représentatifs dans les fruits de *T. garganica* L. étaient : **β -z ocimène** (A: 37,8%, B: 21,3%, C: 36,5%, D: 7,99%, E: 21,9% et F: 5,89%), **α -pinène** (A: 18,3%, B: 12,6%, C: 20,48%, D: 19,0% et E: 21,2%) et **le carène < δ -3>** (A: 12,3%, B: 10,3%, C : 36,5% et E: 13,8%). Selon les paramètres fixés, ils sont en pourcentage élevé en procédant un broyage moyen (250 μ m) (**Fig.57**). Ces composés n'ont pas été détectés dans des échantillons de fruits de *T.garganica* provenant d'Italie **Drew *et al.*, (2012)**, où le composé principal était l'**acétophénone** (22,1%), détecté dans notre étude par PDMS / DVB (G: 0,23%). Selon les résultats de la **figure 57** et du **Tableau 13**, nous avons noté une forte fluctuation de β -(z)ocimène en fonction la masse et de la tailles des particules (AVGC:31,3 à 37,8% et FDCG:7,99 à 21,9%). De même, plus la masse des particules était importante, meilleure est l'extraction de β -z ocimène (**Tableau 13**).

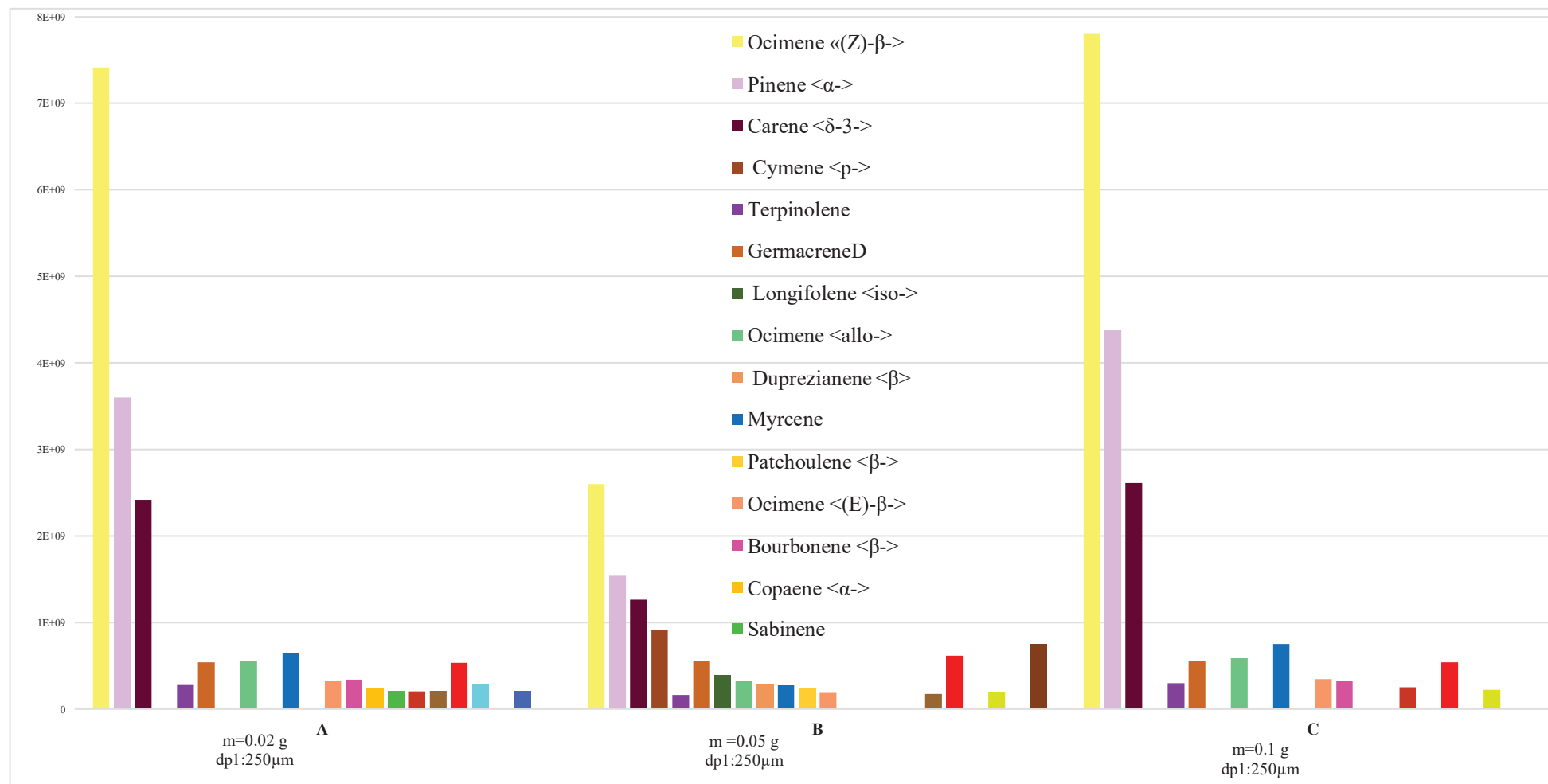


Figure 57 : Effet de la masse (250 µm, broyage cryogénique AVCRG) de *T.garganica* sur les principaux composés isolés par la fibre PDMS

II. Effet de la nature de la fibre sur la composition chimique

Deux types de fibres (PDMS 100 μm , PDMS / DVB 60 μm) ont été utilisés pour évaluer l'effet du choix de la fibre sur l'extraction de composés volatils de *T. garganica*.

Ainsi, l'évaluation de l'effet du revêtement des fibres sur le rendement d'extraction a montré clairement l'efficacité de la PDMS: fibre peu polaire par rapport à la fibre plus polaire PDMS-DVB (plus polaire) avec un rapport des aires de pic $\beta=A1$ (PDMS)/ $A2$ (PDMS- DVB)=431,2 pour les fruits cryogéniquement et moyennement divisés (MD) ($m=0,02$ g, $dp_2=250$ μm). D'où, il semble que l'affinité de la plupart des composants de cette plante soit réalisée avec la PDMS, probablement en raison de la faible polarité des principaux composants essentiellement les composés majeurs.

En effet, le Head space, le facteur de concentration d'un analyte dépend de sa structure et de sa volatilité, des caractéristiques physico-chimiques de la fibre absorbante et de l'affinité analyte/fibre et aussi de certains facteurs physiques tels que l'agitation de la matrice, la température et l'équilibre de l'espace de tête et le taux de diffusion de l'analyte de la phase de vapeur à la surface de la fibre (Zhang et Pawliszyn, 1993). Drew *et al.*, (2012) ont montré que l'utilisation de la SPME fournirait une méthode d'extraction plus précise pour déterminer les volatiles originaux du tissu végétal et la minimisation des artefacts qui se produisent à cause de l'hydrodistillation (Evans, 2009) et ont suggéré que la SPME soit utilisée pour étudier le contenu de la plante car elle est plus douce et été utilisée pour identifier les précurseurs potentiels des lactones sesquiterpéniques de guaianolide de *T.garganica* L. et *T. villosa* L. de type II.

Selon la figure 58, pour une masse $m = 0,02$ g (A), la fibre PDMS a permis d'extraire les monoterpènes hc avec un ratio élevé atteignant une valeur de 451 par rapport à PDMS-DVB (G), alors que l'échantillon AVCG (A) a permis d'extraire cette classe chimique avec une ration de 4.11 par rapport à FDCG (D).

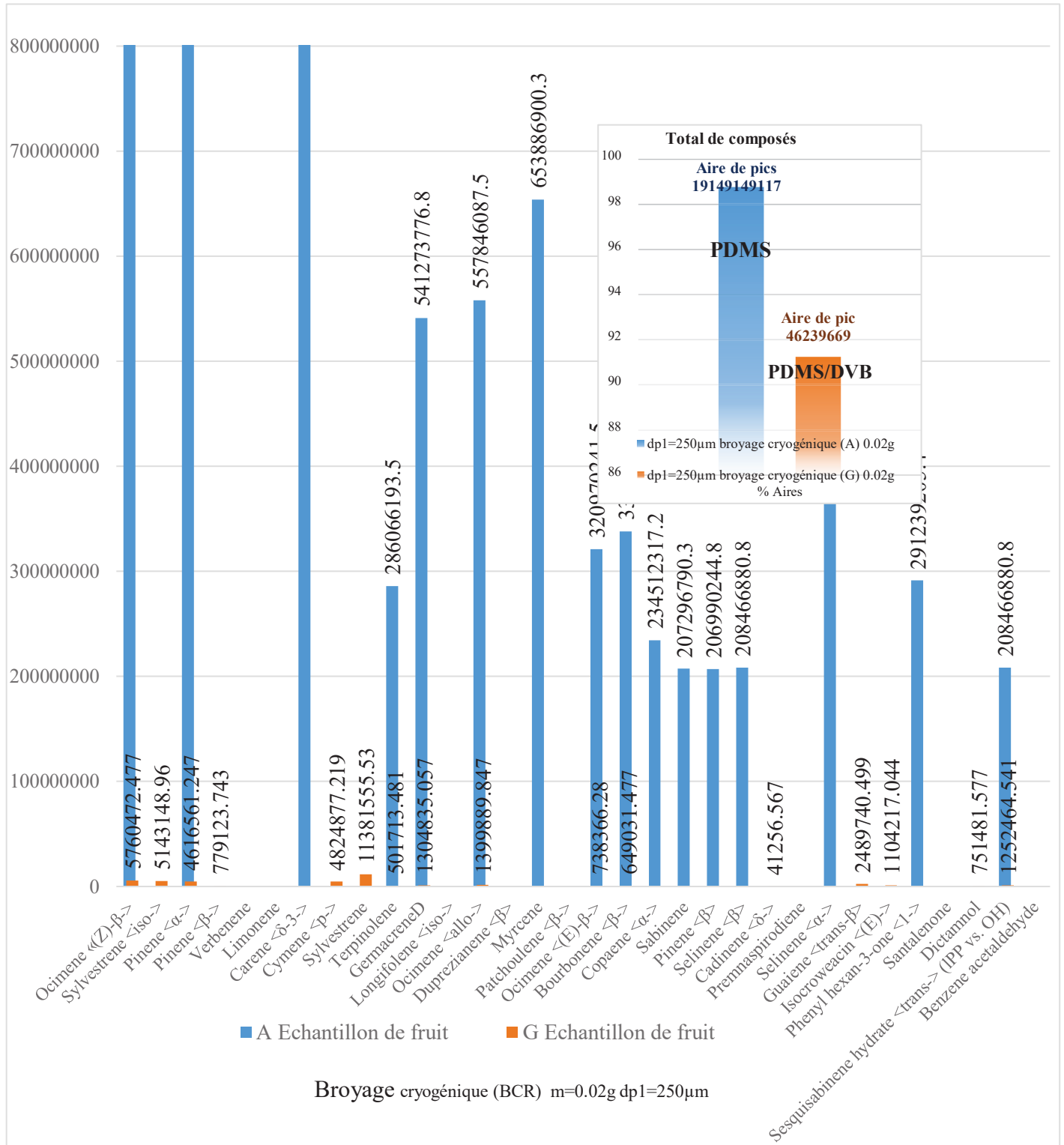


Figure 58 : Effet de type de fibres sur les aires de pics totales et les surfaces de pics individuelles des composés volatils de *T. garganica*

Sur la base des résultats démontrés sur la **figure 58**, la fibre PDMS a été sélectionnée pour l'extraction de composés volatils de *T.garganica*. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Andersen et al., 2015**, montrant que le matériau absorbant PDMS est beaucoup moins susceptible de réarrangement induit en utilisant un acide que la PDMS/DVB, PDMS/CAR et PDMS/CAR/DVB, ainsi que les travaux réalisés par **Bouchachia et al., (2017)**. La PDMS a entraîné une extraction plus élevée des analytes comparée à la fibre DVB/PDMS aussi bien que pour les composés oxygénés avec un rapport A_1 (PDMS) / A_2 (PDMS-DVB) = 202 (G/A).

Comme le montre la **figure 58**, les fibres avec un revêtement de faible polarité, semblent être plus efficaces pour l'extraction des composés volatils des fruits de *T.garganica*. Ceci est probablement dû au fait que la plupart des analytes de l'échantillon sont de faible polarité et sont facilement adsorbés par la fibre non polaire comparée aux composés polaires contenus dans la plante. Ce comportement est probablement lié aussi à la température étudiée (45°C). En effet, pour les basses températures, les résultats peuvent être contradictoires de ceux obtenus précédemment. Sinon, une éventuelle désorption de certains composés polaires à cette température pourrait être responsable de ce phénomène. D'où, il est nécessaire souvent d'étudier différentes températures afin de savoir si la désorption a effectivement eu lieu.

Selon les résultats obtenus (**Fig.58 et Tableau 13**), nous avons noté une affinité élevée du β -(z) ocimène avec le PDMS non-polaire (AVGC : 31,3 à 37,8% et FDCG : 7,99 à 21,9%) par rapport à la PDMS /BVD (11,37%). Nous avons également noté une fluctuation de la composition qualitative selon la variation de certains paramètres, tels que le (+) β -selinène, le δ -3-carène, le terpinène < α ->, le thujène < α ->, et acétate de carvyle <trans> extraits par PDMS et totalement absents dans d'autres d'échantillons analysés avec la fibre polaire.

Dans le cas contraire, plusieurs composants ont une affinité élevée pour la fibre plus polaire PDMS (DVB), tel est le cas de l'échantillon (G) contenant près de 22,5% de **sylvestrène**, alors que ce composé majoritaire n'était pas présent dans les autres échantillons.

Le sylvestrène <iso-> (10,15%); le guaiène <trans- β > (4,91%), le (E)-isocroweacin (2,18%); le dictamnol (1,48%); et le valencène (0,97%); ainsi que nombreux autres composés sont isolés uniquement par la fibre PDMS/DVB en très petites quantités ou en traces. L' α -selinène et le (+) β -selinène ont été détectés en tant que produits mineurs avec d'autres sesquiterpénoïdes inconnus. Ces deux composés sont des sesquiterpènes de type eudesmane, et ont été identifiés comme des produits majeurs avec PDMS/DVB, PDMS/ CAR et PDMS/CAR/DVB à 250°C par **Andersen (2015)** et sont des produits de réarrangement d'acide induit de germacrène A.

Dans la publication récente, l'acétate de geranyle, l'hexanol, l'heptanal, le sulcatone, et le δ -cadinène ont été trouvés comme les terpènes les plus importants de l'huile essentielle des fruits de *T.garganica* d'Italie utilisant la SPME (Drew *et al.*, 2012). Alors que les volatiles des fruits étudiés de *T. Maxima* d'Italie ont montré que le limonène et le méthyl eugénol étaient les constituants basiques (Avato *et al.*, 1992). Plus récemment, les analyses de l'huile volatile provenant des parties aériennes du *T.garganica* de l'Algérie ont été dominées par le p-vinylguaiacol, le 1,4-diméthylazulène et le limonène (Ladjel, 2011).

En outre, les α - et δ -guaiène n'ont pas été détectés dans les huiles essentielles des fruits de *T.garganica*, mais étaient clairement présents lorsque l'analyse a été effectuée par SPME Drew *et al.*, (2012). Tous ces composés sont identifiés en faibles quantités ou en traces dans notre analyse (Tableau 10), la faible quantité de guaiènes observée chez *T.garganica* est conforme à la quantité la plus importante de sesquiterpènes polyoxygénés non volatils rapportés dans des publications antérieures (Christensen *et al.*,1997 ; Drew *et al.*,2009).

III. Effet du mode de broyage sur la composition chimique

Pour les fruits ($m=0,02$ g), qui ont subi un broyage conventionnel (BCL), (F), en comparaison avec les aires de pic des composés totaux (Fig.58), les COV ont été moins extraits. Alors que les rendements sont en pourcentage élevé (par rapport aux extraits totaux (%)) spécialement pour les composés oxygénés, en particulier les alcools, les cétones, les aldéhydes, tandis que les sesquiterpènes h.c atteignent 36,6% l'équivalent de trois fois la quantité initiale pour les particules ($m=0,02$ g) devisées avec broyage cryogénique (A: 12,9%, G: 15,7%). (Tableau 13).

L'effet du mode de broyage est remarquablement significatif pour l'aire de pic totale des chromatogrammes et des classes chimiques, spécialement pour les monoterpènes h.c, sesquiterpènes h.c ainsi que pour les composés oxygénés. Ce comportement (Fig.58) est observé simultanément pour la même taille de particule A (250 μ m) et pour la division fine des particules D (85 μ m) avec un rapport différent variant de $A/F=41.11$ à $D/F=0.07$ respectivement.

La perte de substances volatiles peut être considérablement réduite par le mode de broyage cryogénique (BCRG) à l'aide d'azote liquide (-196°C), qui assure la réfrigération nécessaire pour pré-refroidir les épices et maintenir la température basse souhaitée en absorbant la génération de chaleur pendant l'opération du broyage. La température extrêmement basse dans le broyeur solidifie l'huile de sorte que les épices deviennent fragiles et s'écroulent facilement permettant de broyer à une taille plus fine et plus uniforme. Mais, lorsque le FDCG est chauffé

à 45°C pendant l'extraction de l'espace de tête, les particules fines subissent un colmatage conduisant à une diminution du transfert de masse et donc une réduction du rendement d'extraction.

Le **limonène** est l'un des principaux composés détectés dans les échantillons D (Finement divisé) et F (Broyé cryogéniquement) (21,3 et 13,5% respectivement) et pratiquement absent dans d'autres échantillons (**Tableau 13**). Comme il a été établi, le limonène et le méthyl eugénoïl étaient également des constituants de 27 à 34% et de 59 à 63% respectivement des volatiles de fruits à partir de deux phénotypes de *T. maxima* (**Avato et al.,1992**). Tandis que, la partie aérienne de *T. villosa* du Portugal, contient 57,6% de limonène et 35,9% de méthyl eugénoïl (**Rufino et al.,2015**). Mais ce n'est pas en accord avec les quantités trouvées dans notre analyse, où le méthyl eugénoïl se trouve simplement dans des traces n'excédant pas 0,19% de la surface maximale des composés du chromatogramme.

Ces résultats confirment l'effet du broyage cryogénique pour extraire et préserver un maximum de composés par rapport au broyage classique qui augmente le risque du contact avec la lactone sesquiterpène toxique de Tg. (**Ollivier et al.,2013**); et permettent de conclure la relation entre l'affinité de la fibre et le diamètre de la particule et la masse de l'échantillon. En ce qui concerne la sélectivité de la séparation, le broyage classique reste sélectif pour certains composés mais avec un taux élevé par rapport à celui cryogénique (**Tableaux 12 et 13**).

Une étude antérieure de l'huile essentielle des feuilles de *T. garganica* indique que le p-vinylguaïacol (61,6%), le linalool (6,5%) et le 1,4-diméthylazulène (6,3%) étaient des principaux produits dans les plantes collectées en Algérie (**Ladjel et al. 2011**), et que le bicyclogermacrène (30,8%), le linalool (10,9%), l'acide hexadécanoïque (5,8%) et l'(E)-phytol (5,2%) comme étant les plus identifiés dans une population de Tunisie (**Hassen et al.,2015**). Récemment, le chamazulène a été détecté comme composé principal de la fleur et des feuilles de *T.garganica* en Sicile et non identifié dans d'autres espèces de *Thapsia* (**Casiglia et al.,2015**). Tandis que, la myristicine (15,07%), la β -thujone (14,86%) et l'élémicine (13,06%) ont été identifiés comme étant les principaux composants de l'huile essentielle de l'écorce de racine *T.garganica*.

En outre, une caractéristique intéressante décrite par l'analyse de l'huile de fruit de *T.garganica* était la présence typique d'azulènes (**Avato, 1991**), qui a rapporté alors, que la composition des huiles essentielles des fruits de *T.garganica* est p-vinylguaïacol (61,3%), linalool (8,6 %) et 1,4-diméthylazulène (6,3%).

Selon notre analyse courante, d'autres terpènes ont pu être identifiés comme le p-cyménène, l'allo ocimène et le germacrène D, (qui est identifié comme germacrone le plus détecté et pouvant atteindre 180°C ; (Adio, 2009 ; Anderson *et al.*, 2015); sont identifiés parmi les principaux composés dans les différents échantillons de A à G, suivi par le sabinène, le β -pinène, le terpinolène et le β -E ocimène. Ces observations de la composition peuvent s'expliquer par le fait qu'un seul terpène synthase a la capacité de produire plusieurs terpènes à partir d'un seul substrat. En effet, l'une des premières monoterpènes synthases clonées, (+)-sabinène synthase de *Salvia officinalis*, produit 63% de (+)-sabinène, mais aussi 21% de γ -terpinène, 7,0% de terpinolène, 6,5% de limonène et 2,5% de myrcène dans des essais in vitro (Wise *et al.*, 1998).

Les résultats montrent une différence et une fluctuation de la composition des composés d'hydrocarbures terpéniques selon les différents paramètres. Dans ce cas, plusieurs composés peuvent être identifiés pour certains échantillons mais pas pour d'autres.

Tableau 13 : Composition en pourcentage des volatiles obtenus par la méthode HS-SPME-GC-MS de *T.garganica L.*

		Type de fibre	Fibre PDMS										Fibre PDMS/BVD				
		Mode de broyage	Broyage Cryogénique										Broyage Classique	Broyage Cryogénique			
Classes chimiques	Diamètre des particules		250µm						85µm				250µm				
	Masse des particules (g)		0,02		0,05		0,1		0,02		0,05		0,02		0,02		
	KI ref [Adams, 2007]	Composés chimiques	KI	A	KI	B	KI	C	KI	D	KI	E	KI	F	KI	G	
Monoterpènes	1	926	Tricyclène	925	0,01	929	0,03	924	0,02								
	2	930	Thujène <α->	930	0,22	230	0,15	930	0,25	930	0,29	930	0,3	929	0,03		
	3	939	Pinène <α->	941	18,34	938	12,62	941	20,5	939	18,95	939	21,15	937	3,79	938	9,11
	4	952	Fenchène <α->	950	0,37	954	0,2	950	0,13	950	0,12	950	0,16	950	0,01	950	0,09
	5	954	Camphène	955	0,22	958		955	0,41	955	0,33	955	0,41	954	0,05	955	0,06
	6	975	Sabinène	977	1,06	976	0,73	970	0	976	1,13	977	1,25	976	0,28	977	0
	7	979	Pinène <β->	982	1,05	982	0,76	977	1,17	982	1,06	982	1,16	981	0	980	1,54
	8	987	Mentha-2,8-diène <cis-meta->	987	0,01			982	1,27	992	2,75			987	0,86	589	0
	9	990	Myrcène	993	3,33	992	2,25	993	3,51			989	0			989	0
	10	1002	Carène <δ-2->	1001	0,04	1001	tr	1002		1002	0	1002	0	1002	0	999	0
	11	1008	Sylvestrène <iso->	1006	0	1005	tr	1006	0	1010	13,59	1005	0			1009	10,15
	12	1011	Carène <δ-3->	1012	12,32	1011	10,33	1013	12,22	1012	0,02	1011	13,84	1011	5,27		
	13	1017	Terpinène <α->	1019	0,27	1017	0,04	1019	0,03	1020	0,04	1020	0,03	1017	0,03		
	14	1024	Cymène <p->	1030	0	1025	0,001	1024	0	1023	9	1025	9,28	1023	5,48	1024	9,52
	15	1029	Limonène			1034	tr			1036	21,26			1033	12,48		
	17	1030	Sylvestrène			1037	tr									1033	22,46
	18	1037	Ocimène «(Z)-β->	1040	37,76	1038	21,29	1039	36,48	1041	7,99	1037	21,93	1039	5,89	1039	11,37

	19	1050	Ocimène <(E)-β->	1051	1,63	1050	1,51	1052	1,62	1050	1,65	1050	1,81	1049	1,31	1049	1,46
	20	1059	Terpinène <y->	1063	0,1	1062	0,1	1063	0,11	1062	0,12	1059	0	1062	0,17	1057	0,04
	21	1072	Mentha-3,8-diène <p->	1077	0,06	1076	0,08	1077	0,05					1076	0,09		
	22	1088	Terpinoène	1089	1,46	1089	1,32	1089	1,38	1089	1,43	1089	1,44	1088	1,38	1089	0,99
	23	1091	Cymène <p->	1094	0,1	1094	0,1	1094	0,09	1094	0,08	1094	0,07	1094	0,13	1096	0,24
	24	1132	1132 Ocimène <allo->	1132	2,84	1131	2,68	1131	2,76	1131	2,65	1131	2,78	1130	4,08	1130	2,76
	25	1142	Epoxy-ocimène<(E)->	1142	0,1	1142	0,13			1142	0,1	1142	0,09	1142	0,23		0
	26	1160	Pyrazine <2-acetyl-3-ethyl->	1162	0,05	1162	0,08	1162	0,06	1162	0,02			1162	0,05	1162	0
	27	1167	Viridène	1168	0,08			1168	0,08	1168	0,09					1168	0,05
	28	1249	Isogeyjèrene C														
29	1285	Terpinen-7-al <a->								1285	0,08					1286	0,06
Total%					81,4		54,4		82,1		82,8		75,7		41,61		70,09
Sesquiterpènes	30	1348	Cubebène <α->	1351	0,09	1351	0,14	1350	0,08	1350	0	1351	0,06	1350	0		
	31	1352	Longipinène <α->							1351	0,08					1351	0,1
	32	1376	Isoledène	1376	0,24	1375	0,41			1376	0,19	1375	0,15	1375	0,43	1375	0,27
	33	1376	Copaène <α->	1381	1,19					1378	0,88	1375	tr	1380	3,51	1378	0
	34	1381	Patchoulène <β->			1381	2,03										
	35	1388	Cubebène <β->									1389	1,16				
	36	1388	Bourbonène <β->	1389	1,72			1390	1,52	1390	0,95			1389	4,42	1389	1,28
	37	1390	Longifolène <iso->	1392	tr	1391	3,17	1393	tr	1393	0,56	1392	0,06			1393	0
	38	1400	Longipinène <β->	1401	tr	1401	0,06	1398	0,008	1401	tr	1401	tr				
	39	1407	Longifolène	1405	0,04	1404	tr	1404	0,03	1404	tr	1404	tr				
	40	1411	Cedrène <α-> /Funebrène <α->	1412	0,07	1412	0,13	1412	0,06	1412	0,06	1412	0,05	1412	0,15	1411	0,08
	41	1422	Duprezianène <β>			1427	2,41										
	42	1427	Sefinène <δ->/Guaiène <Cis-p->								1,44	1427	1,09				
	43	1431	Thujopsène <cis->													1433	0,11
	44	1433	Gurjunène <β->	1437	0,49	1437	0,87	1437	0,44	1437	0,41	1437	0,3	1436	0,95	1437	0,2
	45	1441	Aromadendrène	1443	0,05											1440	0
	46	1444	Guaiadiène <6,9->	1447	tr			1445	0,05								
47	1450	Muurola-3,5-diène <cis->	1451	0,19	1452	0,34	1452	0,17	1452	tr			1452	0	1452	0	

48	1453	Muurola-3,5-diène <trans->				tr			1452	0,19	1455	0,25			1452	0
49	1460	Aromadendrène <allo-> /Valencène	1459	0,06	1459	0,11	1460	tr	1460	0,05	1460	0	1459	0	1459	0
50	1462	Aromadendrène <dehydro->			1464	0,15			1464	0,08	1464	0,09	1464	0,35	1464	0,06
51	1466	Caryophyllène <9-epi-(E)->	1464	0,09			1464	0,08				0			1467	0
52	1466	Muurola-4(14),5-diène <CÎs->	1468	0,01	1468	0,02	1468	0,01	1468	0,01	1468	0			1467	0
53	1471	Acoradiène <β->	1474	0,24					1474	0,23					1470	
54	1475	Acoradiène <10-epi-β->	1474		1474	0,45			1474		1474	0,16	1474	0,38	1474	0,17
55	1480	Curcumène <ar->/			1481	0,97			1481	tr	1481	tr	1481	1,15	1481	0
56	1482	Curcumène <y->	1481	0,55	1481	tr	1481	0,52	1481	tr	1481	0,35			1481	0
57	1482	Himachalène <y->								0,48			1484	0		
58	1493	Germacrène D	1490	2,76	1490	4,53	1490	2,58	1489	2,4	1489	1,75	1489	8,15	1489	2,57
59	1493	Selinène <β->	1498	0,79	1498	1,44	1498	0,7	1493	0,76	1498	0,56	1498	2,92	1494	0
60	1496	Valencène													1498	0,97
61	1502	Guaiène <trans-β->													1504	4,91
62	1498	Selinène <α->	1505	2,71	1506	5,04			1505	3,02	1505	2,19	1505	8,47		
63	1498	Pseudowiddrène					1506	2,52								
64	1515	Curcumène<β->	1513	0,08	1513	0,15	1513	0,08	1513	0,05	1513	0,03	1513	0,1	1513	0,08
65	1518	Nootkatène			1519	0,11			1513	tr	1513	tr				
66	1523	Cadinène <δ->	1525	0,4	1525	0,74	1525	0,36	1525	0,07	1525	0,05	1525	2,65	1525	0,08
67	1531	Bisabolène<(E)-y->	1533	0,04	1533	0,07	1533	0,07	1533	tr					1533	0,03
68	1538	Cadinène <α->			1540	0,13							1540	tr		
69	1554	Isocroweacin <(E)->													1551	2,18
70	1555	Vetivénène <po>					1570	0,01								
71	1557	Elemicin	1551	0,01						0,21	1551	0,1	1551	0,39	1558	0,03
72	1565	Calacorène <β->			1563	0,03					1563	0,01				
73	1579	Sesquisabinène hydrate <trans-> (IPP vs.OH)	1569	1,06					1576	1,06	1576	0,75	1576	2,58	1576	2,47
74	1617	Isomyristicin													1615	0,1
75	1880	Laurénène					1877	tr	1877	tr			1877	0,01		

Total%			12,9	23,5	9,26	13,2	9,16	36,61	15,69								
Alcools	76	1070	Octenol «5Z»->	1070	0,03	1070	0,02	1070	0,03								
	77	1096	Linalool	1097	0,08	1097	0,04	1097	0,02	1097	0,04	1097	0,03				
	78	1113	Camphenol <δ->	1113	0,06	1114	0,12	1114	0,04	1114	0,1				1115	0	
	79	1137	Mentha-2,8-dien-1-ol <cis-p->	1139	0	1138	0,05	1138	0,02	1138	0,063			1142	0,12	1137	0
	80	1139	Pinocarveol <trans->					1140	0			1139	0,05			1142	0,07
	81	1148	Isopulegol <neo->									1147	0,08			1147	0,05
	82	1235	Thymol, methyl ether	1232	0,1	1232	0,27	1232	0,2	1232	0,08	1232	0,07	1232	0,17	1232	0,06
	83	1244	Carvacrol, methyl ether	1241	0,12	1241	0,17	1241	0,08	1241	0,08	1241	0,07	1241	0,83	1241	0,05
	84	1290	Cymen-7-ol <p->											1297	0,12		
	85	1298	Carvacrol, ethyl ether			1295	0,08	1295	0	1295	0	1297	0,01	1298	0		
	86	1299	Carvacrol	1303	0,11	1303	0,16	1303	0,11	1303	0,1	1303	0,09			1307	0
	87	1309	Guaiacol <p-vinyl->	1309	0,01	1309	0,01			1308	0,003	1308	0	1312	0,01		
	88	1359	Eugenol	1361	0,1	1360	0,15	1357	0,08	1559	0,08	1357	0				
	89	1403	Methyl eugenol	1402	0					1403	0,06	1402	0,04	1403	0	1403	0,19
	90	1429	Dictamnol													1427	1,48
	91	1519	Silphiperfolan-6-β-ol <7-epi->							1519	0,06	1518	0,04				
	92	1596	Fokienol	1595	0,08	1595	0,15	1595	0,08			1595	0,05				
	93	1677	Guaia-3,10(14)-dien-11-ol	1676	0,02	1676	0	1673	0,03								
	94	1662	Eudésmol <dihydro->							1659	0,22						
95	1675	Helifolenol A											1672	0,3	1672	0,2	
96	1700	Amorpha-4,9-dien-2-ol	1702	0,01			1706	0	1702	0,01			1703	0,04			
97	1741	Farnesol «2E,6E»->	1744	0,01					1744	0	1744	0	1744	0,01			
Total%				0,73	1,22		0,69		0,89		0,53		1,6		2,1		
Cétone	98	1164	Pinocarvone								1168	0,09					
	99	1180	Isocitral <(E)->	1178	0,09	1179	0,12										
	100	1192	Dihydro carvone <cis->			1192	0,25	1192	0,16					1193	0,7	1193	0,255
	101	1200	Dihydro carvone (trans->					1203	0,07	1203	0,004			1203	0,28		
	102	1205	Verbenone			1203	0,6					1213	0	1213	tr		
	103	1217	Isophorone «4-méthylène»->	1219	0,034	1213	0,04			1219	0,03	1219	0,02	1219	0,1	1219	0
	104	1252	Thymoquinone	1255	0,25	1255	0,26	1255	0,14	1255	0,14			1255	0,48	1255	0,12

	105	1298	Acetophenone <3'-methoxy->							1297	0,01	1298	0			1303	0,233
	106	1360	Nepetalactone <4aa,7a,7aa->									1359	0,07			1361	0,12
	107	1577	Santalénone	1567	0,014	1577	1,65	1577	1,04	1563	0,02						
Total%					0,39		2,92		1,41		0,20		0,18		1,56		0,728
Ethers	108	1093	Ethyl sorbate											1097	0,16		
	109	1216	Linalool formate													1216	0,09
	110	1265	Chrysanthenyl acétate <cis->	1260	0,24	1260	0,39			1259	0,04						
	111	1257	Linalool acétate									1255	0,13				
	112	1282	Verbenyl acétate <cis->	1283	0,19	1283	0,29	1283	0,21	1283	0	1283	0,08	1283	0	1283	0
	113	1292	Verbenyl acétate <trans->	1291	0,32	1291	0,43	1291	0,25							1299	0
	114	1312	Pinocarvyl acétate <cis->	1312	0,01	1312	0,01	1312	0,01								
	115	1342	Carvyl acétate <trans->	1343	0,01	1343	0,02			1343	0,01	1342	0,01	1342	0,03	1343	0
	116	1380	Verbenyl acétate <cis->													1380	0,69
	117	1418	Ethyl-(2E)-decenoate	1419	0,01	1419	0,02	1419	0,01	1419	0,02			1419	0,08	1419	0,04
	118	1805	Santalol acétate «(Z)-epi-β->	1805	0,18	1811	0,03			1805	0,13	1804	0,1	1805	0,34	1805	0,25
119	1819	Santalol acétate «Z-β->	1818	0,01			1818	0,01	1818	0,01	1818	0,01	1818	0,01	1816	0	
Total%					0,97		1,19		0,49		0,21		0,33		0,62		1,07
Aldéhydes	120	1042	Benzène acetaldéhyde			1041	6,09					1042	7,65	1044	0,01		
	121	1271	Perilla aldéhyde	1271	0,07	1272	0,11	1273	0,07	1272	0,08	1271	0	1272	0,28	1272	0,04
	122	1314	Trimethyl benzaldéhyde <2,3,4->	1318	0,12			1318	0,15	1318	0,09	1318	0,09	1318	0,18	1318	0,48
	123	1319	Cinnamaldéhyde «α-methyl->			1319	0,18										
124	1328	Limonène aldéhyde								1327	0,04	1327	0,03	1327	0,21	1328	0,04
Total%					0,19		6,38		0,22		0,21		7,77		0,68		0,56
<u>% Total des composés</u>					96,6		89,6		94,2		97,5		93,7		83		90,24

IV. Analyse statistique

1. Distribution et relation entre variables

Afin de déterminer la nature et le degré de divergence entre les différents pourcentages de composition de chaque échantillon de fruits par rapport aux différents composés chimiques identifiés, une analyse de la composante principale (ACP) est effectuée. (Fig.59 et tableau 14).

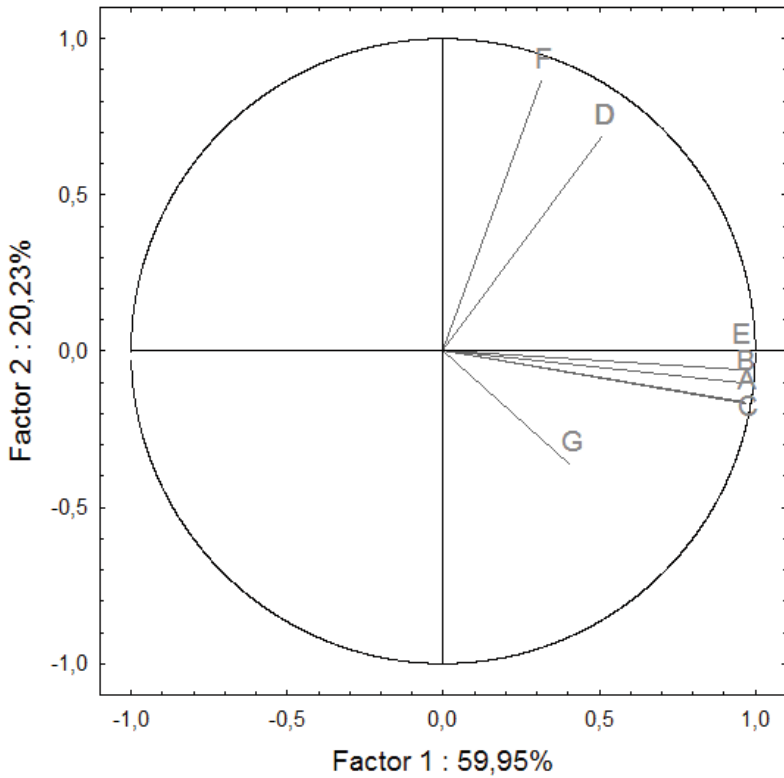


Tableau 14: Matrice de Corrélation

Variables	Correlations (Spreadsheet3)						
	A	B	C	D	E	F	G
A	1.000000	0,971738	0,994157	0,310998	0,883637	0,177307	0,321854
B		1.000000	0,965022	0,303014	0,898538	0,252344	0,269770
C			1.000000	0,347451	0,900928	0,148142	0,337228
D				1.000000	0,464334	0,592289	0,165019
E					1.000000	0,204674	0,372216
F						1.000000	0,122549
G							1.000000

Figure 59 : Cercle de corrélation

La représentation du cercle de corrélation des variables de la volatile des fruits (Fig .59) montre que les axes factor1 et factor2 expriment respectivement 59,95% et 20,23% de la variabilité totale, et la distribution des composantes de classe révèle l'existence des corrélations entre certaines variables étudiées, comme la corrélation entre A, B, C, E et G, liée à l'axe I (facteur 1), ainsi que la corrélation entre D et F qui sont regroupés par l'axe 2 (facteur 2), celle-ci participe avec 60% de son entraînement.

En même temps, la matrice de corrélation confirme la corrélation des particules de fruits divisés à $dp1 = 250\mu m$, entre (A; B = 0,97), (A; C = 0,99), (B; C = 0,96); cette corrélation est faible par rapport aux échantillons divisés à $dp2 = 85 \mu m$ dont (D; E = 0,46). Cela confirme que $dp1$ est le diamètre le plus efficace pour extraire plus de composés de la plante. (Tableau 14).

Il est à noter que la corrélation entre les fruits analysés A et F (0,18) et A et G (0,32) est très faible, (**Tableau 14**); Ceci explique la grande variation entre les différents paramètres testés, et que le mode de broyage et la nature de la fibre influent significativement sur le profil chimique de l'huile volatile de fruits de *T. garganica L.*

2. Analyse de 1 composante principale (ACP) et classification ascendante hiérarchique (CAH) des principaux composés identifiés

Les méthodes ACP et CAH ont été utilisées pour l'étude statistique. Le pourcentage des vingt composants principaux d'extraits de fruits sélectionnés était significativement différent ($p < 0,05$) entre les échantillons (**Tableau 14**). L'axe horizontal ACP (axe1) expliquait 59,95% de la variance totale, tandis que l'axe vertical (axe 2) expliquait 20,23%. (**Fig.60**).

Il a été montré que les projections des composés étaient clairement séparées en cinq groupes distincts comprenant des composés ayant une symétrie opposée à l'axe 1, distingués séparément. La répartition des différents composés chimiques sur les deux axes de l'ACP (**Fig.60**) vis-à-vis de leurs présences dans les différents échantillons étudiés a révélé 5 groupes de composés par rapport à la symétrie axiale relative au facteur 1.

Le groupe I ((α)selinène, germacrène D, (ρ) cymène, (β) boudrène, (β) sélinène, ocimène) et le groupe II [mentha-2,8-diène (méta), hydrate de sesquisabinène <vs OH), sabinène, (β) ocimène (E), myrcène, terpinolène, (α) cédrène et (β) pinène)] ont une symétrie par rapport à l'axe 1. Cependant, le groupe 3, qui est un groupe intermédiaire, contient les trois principaux composés communs pour tous les échantillons testés. Le groupe 4 représenté par le **limonène** ainsi que le 5ème groupe (contenant du **sylvestrène**) ont une symétrie par rapport à l'axe 1.

La distribution de ces groupes a été confirmée en utilisant la méthode CAH selon les paramètres étudiés (**Fig.61**) qui spécifie quelles variables étaient responsables de la projection d'échantillons dans le plan factoriel (PC 1 x PC 2).

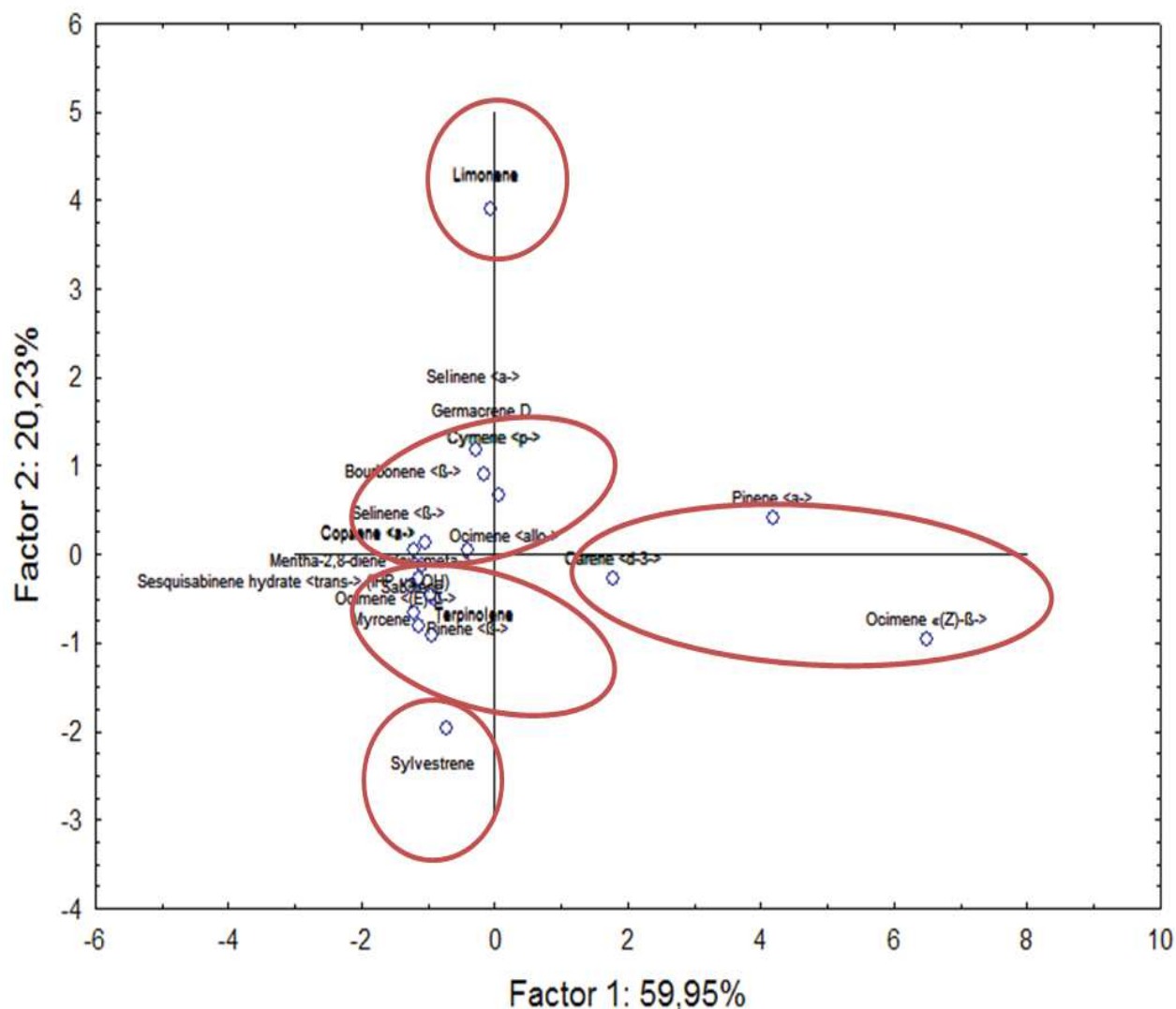


Figure 60 : Distribution des 20 principaux composés chimiques (CC) de la volatile de fruits (symétrie entre les distributions de (CC) en fonction de leur effet par rapport aux variables étudiées)

Avec une dissimilarité de 38, le CAH basé sur la distance euclidienne entre les groupes a indiqué deux groupes de composés I et II (**Fig.61**). Le groupe II a renfermé la majeure partie des composés, il est subdivisé avec une dissimilarité > 22, en trois sous-groupes (II1, II2 et II3). Le groupe II1 se compose de deux sous-groupes.

A cet effet, quatre groupes de composés sont observés. Le p-cymène, l'ocimène (allo), le germacrène D et l' α -selinène constituent le premier groupe des principaux composés contenus dans le fruit de *T. garganica*. Un deuxième groupe contient dix composés: β -pinène, hydrate de sesquisabinène <trans> (IPP vs OH), sabinène, β -pinène, β -ocimène E, terpinolène, mentha-2,8-diène (méta), (α) cédrène et myrcène. Alors que le limonène et le sylvestrène, montrant une corrélation négative avec l'axe 1 dans l'analyse ACP, se détachent clairement en formant des groupes séparés, montrant ainsi un seul groupe dans l'analyse CAH (**Fig.61**).

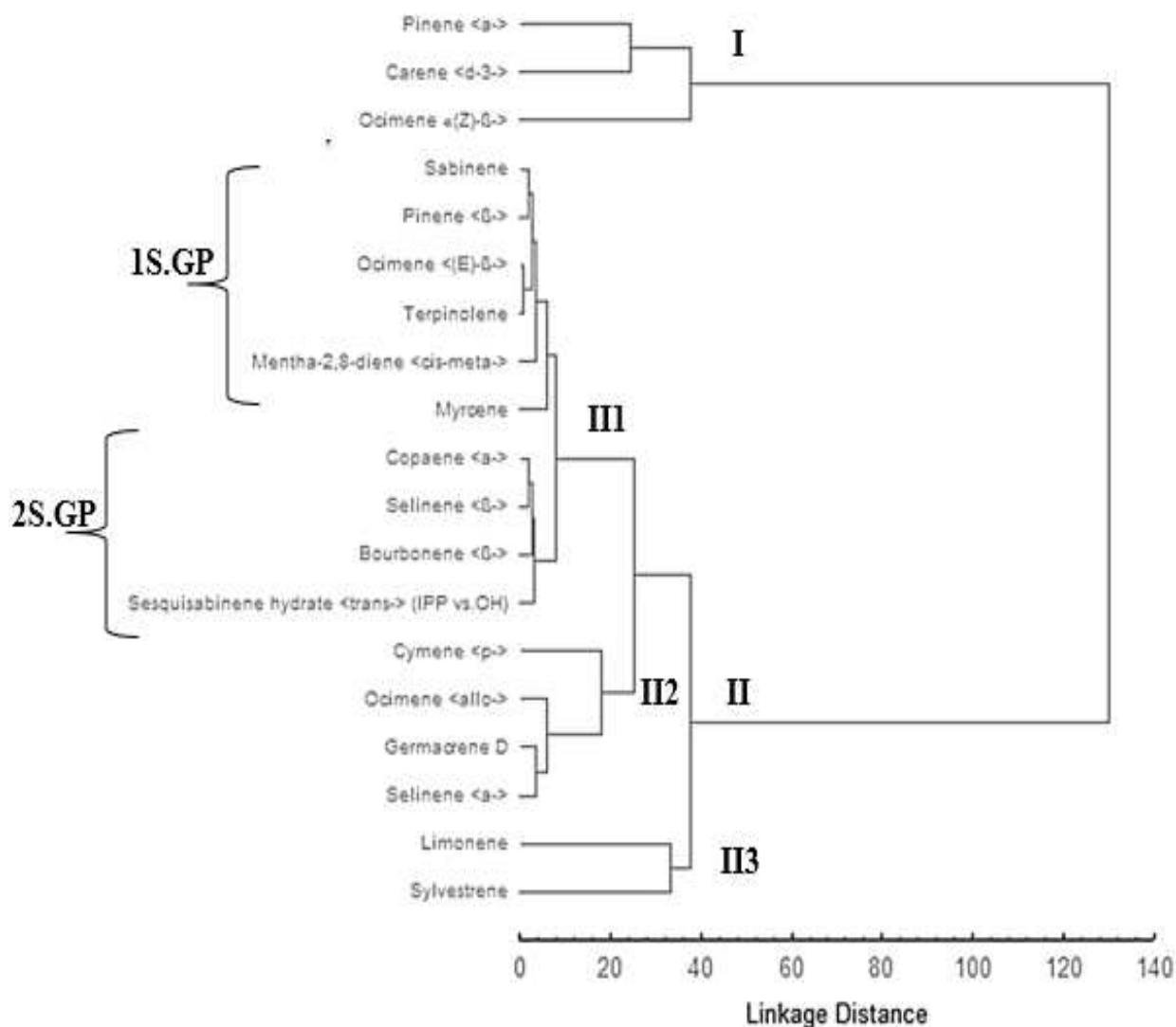


Figure 61 : Dendrogramme obtenu par analyse de classification ascendante hiérarchique basée sur l'Euclidien Distance entre les groupes des principaux composés des fruits de *T. garganica*

En outre, nous avons noté que le groupe I comprenait trois composés principaux : α -pinène, Z- β -ocimène et δ -3-carène, communs pour la plupart des échantillons, en particulier les échantillons AVCG (avec un pourcentage moyen pour A: 22,8% \pm 13.3, B: 14,7% \pm 5.78 et C: 23,06% \pm 12.3 respectivement).

Le deuxième groupe (III) comprend le sous-groupe 1 avec six composés mineurs (Sabinène, β -pinène, E- β -ocimène, terpinolène, cis, méta-menthe-2, 8-diène et myrcène) caractérisant A, C et D avec un pourcentage moyen élevé (1.23% \pm 1.12, 1.29% \pm 1.17 et 1.15% \pm 0.95). Une teneur globale modérée de ces composés a été notée dans B (0.95% \pm 0.79) et E (0.8% \pm 0.77). Alors que, pour les échantillons de broyage classique (F) et de fibre PDMS-DVB (G), ces composés n'étaient pas caractéristiques, une faible teneur a été notée (0,56% \pm 0,6 et 0,58% \pm 0,72 respectivement).

Le **myrcène** était le composé caractéristique des fruits de *T. garganica* de ce sous-groupe essentiellement pour $dp_1 = 250 \mu\text{m}$ (A = 3.33%, B = 2.25% et C = 3.51%) et totalement absent pour les autres échantillons.

Le sous-groupe 2 contient les pourcentages les plus faibles de composés volatiles caractéristiques des fruits de *T. garganica* tels que l' α -copaène, le β -sélinène, le β -bourbonène, l'hydrate de trans-sesquisabinène (IPP vs OH), avec un% moyen de A:1,19 \pm 0,39, B:0,36 \pm 0,72, C:0,55 \pm 0,72, D:0,91 \pm 0,12, E:0,33 \pm 0,38, F:3,36 \pm 0,8 et G:0,9 \pm 1,18.

Le groupe II-2 comprend des composés volatiles spécifiques de l'échantillon F(CLG) (p-cymène, germacrène D, ocimène<allo-> et α -selinène) avec un pourcentage moyen total élevé (6.55% \pm 2.12) par rapport aux autres échantillons (A:2,1 % \pm 1,38, B:3,06% \pm 2,27, C:1,34% \pm 1,54, D:4,27% \pm 3,16, E:4% \pm 3,5 et G:3,7% \pm 4,07).

Le groupe II3 a été réduit aux volatiles de fruits de *T.garganica* caractérisés par seulement deux composants, le **limonène** (E: 21,26% et F: 12,48% en moyenne) et le **sylvestrène** extrait en grande quantité uniquement par la fibre DVB/PDMS (G:22,46%), ne dépassant pas 1,5% dans les autres échantillons.

V. Conclusion

En utilisant la technique HS-SPME, les hydrocarbures monoterpéniques représentent plus de la moitié des constituants de tous les échantillons extraits par PDMS, représentés essentiellement par β -Z ocimène, α -pinène et carèn < δ 3>. Alors que les composés sesquiterpéniques étaient plus extraits par le broyage classique (G = 36,6%), en comparaison

Les résultats suggèrent que l'analyse HS-SPME-GC-MS (avec une fibre PDMS et un diamètre de particule de 250 μm) constitue une méthode rapide et reproductible et des aires plus importantes en associant un broyage cryogénique. Nous suggérons qu'une masse de 0,05 g puisse être sélectionnée comme valeur optimale pendant le processus d'analyse, afin d'extraire le maximum d'analytes avec des aires de pic élevées.

Pour les échantillons analysés par la fibre PDMS ; Les composés oxygénés sont plus représentés par des cétones pour des échantillons broyés cryogéniquement avec $dp_1 = 250 \mu\text{m}$, et par des alcools pour des échantillons analysés par des fibres PDMS / BVD.

Par ailleurs, le limonène et le sylvestrène sont deux composés formant un seul groupe, caractérisant seulement deux classes de fruits testées E et F.

Plus d'un composé pourrait être identifié à l'aide de la fibre PDMS, bien qu'en petite quantité, cela s'explique par l'affinité de certains composés chimiques à la fibre d'analyse, c'est le cas du **sylvetrène**, qui est estimé parmi les composés prédominants identifié en utilisant une fibre moins polaire PDMS / DVB, alors qu'il n'est pas identifié par la fibre PDMS. Cela a été particulièrement confirmé dans le cas des sesquiterpènes, qui ont été détectés à des taux faibles ou pas du tout dans des extraits volatils analysés par la fibre PDMS, mais qui constituaient les composantes majeures de la volatile des fruits en utilisant la fibre PDMS/DVB. Cette caractéristique unique facilite l'application de la SPME dans l'évaluation des compositions de COV à partir de fruits dans différents cultivars, dans des étapes de maturation ou pendant le stockage pour obtenir des bénéfices plus économiques. En outre, la SPME-GC-MS peut fournir des quantités considérables de données pour l'analyse des composantes principales, l'analyse quantitative et l'analyse sensorielle (Voon *et al.*,2007 ; Jetti *et al.*,2007 ; Guzmán-Gerónimo *et al.*,2008 ; Vázquez-Araújo *et al.*,2011 ; Kraujalyte *et al.*,2012), ou il peut être directement couplé à l'olfactométrie GC.

L'analyse chimique PCA et CAH a séparé tous les composés chimiques en cinq groupes et sous-groupes, caractérisant chacun des échantillons.

Approches

La SPME in vivo n'a pas été appliquée à l'analyse des fruits. Pour cela, les fruits doivent être intacts et toujours attachés à l'arbre. Toutes les applications ont été réalisées avec des méthodes in vitro pour l'analyse SPME. Les échantillons ont été d'abord broyés, homogénéisés, puis broyés en poudre avant l'extraction. Les résultats ne reflètent probablement pas le contenu réel d'analytes. Des pertes ou changement du composé cible pourraient s'effectuer pendant ces processus. Les résultats peuvent varier en exerçant différentes méthodes de préparation des échantillons qui ne permettent pas de suivre l'évolution des COV ou d'autres composés organiques dans les fruits dans des différentes conditions de saisons, températures et stades de croissance. Pour optimiser le rendement et le parfum en huiles essentielles, il est primordial de cueillir les fruits au moment approprié lors de la récolte des huiles essentielles de fruits. Dans ce cas l'échantillonnage in vivo de la SPME non-structurant devrait être une technique prometteuse, mais certains défis techniques doivent être surmontés pour étendre ses applications à l'analyse des plantes. Parmi eux, la sensibilité de la technique SPME qui nécessite un développement de nouvelles phases d'extraction avec des rendements d'extraction élevés et une bonne sélectivité facilitera l'application de la technique d'échantillonnage in vivo SPME pendant l'analyse des plantes.

La quantification des résultats obtenus par échantillonnage SPME in vivo est un autre défi, nécessitant d'adopter ou développer une méthode d'étalonnage pratique et appropriée. Le coût pourrait être un autre problème de SPME in vivo.

La reproductibilité de l'échantillonnage in vivo de SPME est affectée en raison de la matrice d'échantillons complexes dans un système végétal vivant, qui provoque l'encrassement du revêtement de la fibre SPME. Les fibres SPME uniques sont fortement recommandées. Bien que la fibre commerciale SPME contenant le groupe fonctionnel C18 pour l'échantillonnage in vivo soit beaucoup moins chère que d'autres fibres commerciales du SPME, une bonne reproductibilité entre ces fibres peut être obtenue. Elles comprennent la facilité de production et le faible coût, mais le PDMS est le seul matériau de revêtement existant, limitant l'application de la fibre. Plus de fibres à faible coût et à haute sensibilité pour l'échantillonnage in vivo de différents composés dans les plantes vivantes seront nécessaires à l'avenir.

Conclusion

Conclusion générale

La disponibilité des substances actives naturelles est rendue possible par la grande diversité des espèces. Cette richesse en espèces qui donnera lieu à la découverte de molécules à intérêt et à l'innovation donc de nouvelles techniques de valorisation de ces molécules et d'applications. Une caractérisation chimique des molécules naturelles constitue le point de départ incontournable de l'étude de la chimiodiversité dans notre travail, où dans un premier lieu, l'espèce a été identifiée par extraction d'ADN et enregistrée dans la base des données afin d'affirmer qu'il s'agit bien et pour les deux endroits de la collecte (Médéa et Béjaia) de *Thapsia garganica* L.

Le travail a débuté par un traitement des échantillons étudiés avec les irradiations gamma, afin de mettre en évidence l'effet de ce nouveau procédé de conservation sur la stabilité de la composition chimique des extraits de la plante dont plusieurs méthodes d'extraction ont été utilisées à savoir l'extraction par micro-onde (ESAM), la macération (MC), et l'extraction classique en utilisant l'azote liquide pour le broyage des parties de la plante (EC). Grâce à l'analyse HPLC, il a été possible d'avoir un profil chimique qualitatif et quantitatif des trois principaux composés spécifiques au genre auquel appartient la plante : thapsigargine (Tg), thapsigargicine (Tc) et nortrilobolide (Nb). Cette étude a confirmé que les racines de *T.garganica* provenant de Béjaia étaient plus riches en composés Tg et Tc que celles de Médéa et encore plus que les feuilles de la plante ; alors que la Nb est détectée en petites quantités dans les deux parties de la plante, où le traitement par irradiation n'a pas influencé sur cette composition.

Les résultats obtenus ont poussé à évaluer l'activité antioxydante de la plante. Ainsi, la capacité anti-radicalaire du teste ABTS était plus importante que celle testée par DPPH, d'où l'efficacité et la rapidité de ce test. Les extraits de feuilles de *T.garganica* ont montré une très bonne activité antioxydante par rapport aux racines, en particulier celle de Béjaia, cela induit à constater que cette activité n'est pas liée à la concentration de la plante en thapsigargins mais aux taux de polyphénols que contient la plante rapportés par la littérature.

Toutefois, aucune variation significative des valeurs des IC50 n'a été notée sous l'effet des irradiations gamma, tout en conservant la même tendance et le même profil. Par contre le potentiel antioxydant était affecté par localité où la plante est collectée et par les méthodes d'extraction. La capacité antioxydante des extraits méthanoliques de *T.garganica* indique que cette plante peut être une source importante de produits naturels à activité chimio-préventive et chimio-thérapeutique.

Pour l'évaluation de la variabilité chimique intraspécifique chez *T. garganica*, la composition des volatiles de feuilles et de racines de populations provenant des deux régions ont été étudiée par la technique HS-SPME qui a permis l'identification d'une centaine de composés. Dont les principaux étaient : **norbornène <S-méthylène-2->**, **verbenène** , **anéthole** , **biotone** et **sabina kétone <déhydro->**.

La différence en composition est étroitement liée à la présence et aux taux des principaux composés majoritaires dans les différentes parties de la plante.

L'étude de l'effet de l'irradiation gamma sur l'aspect qualitatif et quantitatif du profil chimique de la volatile de *T.garganica*, effectuée sur des feuilles irradiées de *Thapsia* originaire de Médéa a prouvé une meilleure extraction des composés volatiles par la fibre PDMS à des grandes fréquences d'irradiation et surtout pour la masse $m=0,1$ g, cela plus spécifiquement pour les terpénoïdes. Et sont présentés principalement par le **camphène**, le **myrcène**, le **ocimène<(E)- β >** et le **longipinène < β >**. Alors que l'irradiation gamma n'a exercé aucun effet sur la composition chimique de la volatile des feuilles de *T.garganica* provenant de Béjaïa analysées par la fibre PDMS/DVB, par contre une stabilité quantitative de la composition totale du volatile a été remarquée. Ces dernières sont caractérisées par la présence spécifiquement de **germacrène B**.

Les résultats permettent de conclure que la différence interspécifique des taux des classes chimiques dans les parties de la plante est liée aux teneurs en principaux composés chimiques qui peuvent être identifiés et constituant chaque classe, selon leurs polarité et leur affinité aux fibres d'analyse. Mais aussi, la composition d'extrait spécifique à la partie de la plante est discutée en relation avec leurs fonctions biologiques et écologiques, cette dernière dépend de l'espèce, de la provenance et du patrimoine génétique.

La seconde partie de cette étude a été consacrée à l'identification des composés de la fraction volatile des graines de *T. garganica* des monts de Djurdjura en utilisant la technique de head space-SPME qui nous a permis d'avoir des résultats satisfaisants. En fixant un nombre de paramètres de mesure afin d'optimiser une meilleure méthode permettant d'extraire le maximum de composés de la plante.

T. garganica est avérée de chémotype β -(Z) Ocimène, sa teneur (38% environ) obtenue par broyage classique, présentant une grande affinité avec le PDMS non-polaire.

Nous avons noté une fluctuation dans les aires de pic totales selon la masse de l'échantillon utilisée ainsi que pour la taille des particules étudiées en particulier pour les monoterpènes hydrocarbures.

Sur cette base, la taille des particules de 250 μm a été adoptée à cette fin, qui correspond à la plus grande quantité d'échantillon 0,1 g, comparée à 0,05 g pour $dp_2 = 85 \mu\text{m}$. Et que la perte de substances volatiles peut être considérablement réduite par le mode de broyage cryogénique (BCG) à l'aide de l'azote liquide (-196°C).

L'utilisation des deux fibres différentes la polydiméthylsiloxane (PDMS) et la polydiméthylsiloxane-divinylbenzène (PDMS-DVB), nous a permis de constater que la polarité de la fibre a une influence significative sur le profil aromato-chimique.

La fibre PDMS a entraîné une extraction plus importante des analytes que la fibre DVB/PDMS aussi bien que pour les composés oxygénés et que cette dernière a été sélectionnée pour l'extraction de composés volatils dans la plante de *T.garganica*.

Dans le cas contraire, l'affinité de la PDMS-DVB pour les composés les plus polaires a été enregistrée, cas d'échantillon (G) mentionnant que le **sylvestrène** (22,5%), est un composé principal qui n'était pas présent dans les autres échantillons.

L'utilisation de la HS-SPME est fortement conditionnée par le choix de la fibre, par la polarité et la volatilité des composés à étudier et par la composition et l'état physique de la matrice végétale.

L'avantage de cette technique est également l'amélioration de la fiabilité de l'analyse en minimisant les contaminations et les pertes dû aux différentes manipulations et aux thermo dégradations de l'extrait volatil.

Ces dernières méthodes (extractions assistées par micro-ondes et la HS-SPME) ont l'avantage d'être des techniques propres et relativement rapides.

De même, La rapidité d'exécution, la spécificité du chauffage micro-ondes, l'économie d'énergie, la simplicité de mise en œuvre sont les principaux atouts de l'extraction assistée par micro-ondes.

La HS-SPME contribue favorablement à l'identification des principaux composés de la plante étudiée. Plusieurs paramètres sont à prendre en considération au cours de l'extraction végétale. En premier lieu la matière première qui est la plus difficile à maîtriser ; son origine géographique, les conditions climatiques où la collecte est faite, ainsi que la connaissance et les pratiques socio-culturelles ; pour une même espèce, la qualité de l'extrait peut être variable suivant les manipulations et le type de broyage du matériel végétal, le méthode d'extraction, le solvant utilisé, la température. En effet, des études préliminaires et une optimisation des méthodes adaptées sont encouragées avant chaque travail sur le végétal vu sa variabilité.

D'autre part des études approfondies sur les activités biologiques de *Thapsia garganica* originaire de l'Algérie sont nécessaires à être réalisées afin de prouver ses vertus thérapeutiques, médicinales et pharmacologiques ainsi connues depuis longtemps.

*Références
bibliographiques*

Références

1. (*) USDA, ARS, Germplasm Resources Information Network. *Thapsia garganica* in the Germplasm Resources Information Network (GRIN), U.S. Department of Agriculture Agricultural Research Service. Accessed on 09-Oct-10.
 2. Abderrahim O., Martin G.J., Abdelaziz A., (2013). Botanical identification and ethno-medicinal uses of some underground part of medicinal plants collected and traded in Marrakech region. *J.Med. Plants Res.* 7, 2165–2169.
 3. Abert Vian M., Fernandez X., Visinoni, F., Chemat F., (2008). Microwave hydro-diffusion and gravity: A new device for extraction essential oils. *J. Chromatogr. A.* 1190, 14–17.
 4. Adams R. P., (2007). Identification Of Essential Oil Components By Gas Chromatography/ Mass Spectrometry, 4th Ed. 804.
 5. Adio A.M., (2009). Germacrenes A–E and related compounds: Thermal, photochemical and acid induced transannular cyclizations. *Tetrahedron.* 65, 1533–1552.
 6. Aguinaga N., Campillo N., Vinas P., Hernandez-Cordoba M., (2007). Determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in milk and related products using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry; *Analytica. Chimica. Acta.* 596, 285–290.
 7. Ahamed K. F. H. N., Kumar V., Raja S., Mukherjee K., Mukherjee P. K., (2005). Antinociceptive and anti-inflammatory activity of *Araucaria bidwillii* Hook. *Iran J. Pharmacol Ther.*, 4,105-109.
 8. Akloul R., Benkaci-Ali F., Eppe G., (2014). Kinetic study of volatile oil of *Curcuma longa* L. rhizome and *Carum carvi* L. fruits extracted by microwave-assisted techniques using the cryogrinding. *Journal of Essential Oil Research.* 26(6), 473-485.
 9. Alencar N.L., Araújo T.A.S., Amorim E.L.C. et al., (2010). The inclusion and selection of medicinal plants in traditional pharmacopoeias - evidence in support of the diversification hypothesis. *Econ Bot* 64:68–79.
 10. Ali H., Christensen S.B., Foreman J.C., Pearce F.L., Piotrowski W., Thastrup O., (1985). The ability of thapsigargin and thapsigarginin to activate cells involved in the inflammatory response. *Br. J. Pharmacol.*, 85:705–12.
 11. Anastas, P. T.; Warner, J. C. 1998. *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press: New York.
 12. Andersen T.B., Cozzi F., Simonsen H.T., (2015). Optimization of Biochemical Screening Methods for Volatile and Unstable Sesquiterpenoids Using HS-SPME-GCMS. *Chromatography.* 2, 277-292.
-

Références

13. Andrews S.P., Tait M.M., Ball M., Ley S.V., (2007). Design and total synthesis of unnatural analogues of the sub-nanomolar SERCA inhibitor thapsigargin. *Org. Biomol. Chem.*, 5, 1427-1436.
 14. Anterola A., Shanle E., Perroud P.-F., Quatrano R., (2009). Production of taxa-4(5),11(12)-diene by transgenic *Physcomitrella patens*. *Transgenic Res.*, 18, 655–660.
 15. Antonelli A., Fabbri C., Boselli E., (1998). Modifications of dried basil (*Ocimum basilicum*) leaf oil by gamma and microwave irradiation, *Food Chemistry*, 63(4):485-489.
 16. Applegate K., Chipley J., (1973). Increased aflatoxin production by *Aspergillus flavus* via cobalt irradiation. *Poult. Sci.* 52, 1492-1496.
 17. Applegate K., Chipley J., (1974). Effects of ⁶⁰Co gamma irradiation on aflatoxin B1 and B2 production by *Aspergillus flavus*. *Mycologia* 66, 436-445.
 18. Arthur C.L., Pawliszyn J., (1990). Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.*, 62 (19), 2145–2148.
 19. Arthur C.L., Killam L.M., Buchholz K.D., Pawliszyn J., (1992). Automation and Optimization of Solid-Phase Micro-extraction. *Anal. Chem.*, 64, 1960-1966.
 20. Ashton N., Cove D., (1977). The isolation and preliminary characterisation of auxotrophic and analogue resistant mutants of the moss, *Physcomitrella patens*. *Mol. Gen. Genet.*, 154, 87–95.
 21. Athmouni K. , Belghith T., Bellassouad K., Elfeki A., Ayadi H., (2015). Effect of solvent polarity on the content of biomolecules and antioxidant activity of *Thapsia garganica* (Apiaceae). *Algerian J. Nat. Products*. 3:3,194-208.
 22. Avato R., (1991). Essential oil of *Thapsia garganica*. *Planta Med.* 57, 585.
 23. Avato P., Jacobsen N., Smitt U.W., (1992). Chemotaxonomy of *Thapsia maxima* Miller. Constituents of the essential oil of the fruits. *J. Essent Oil Res.*, 4: 467– 473.
 24. Avato P., Fanizzi F.P., Rosito I., (2001). The genus *Thapsia* as a source of petroselinic acid. *Lipids*. 36: 845-50.
 25. Avato P., Rosito I., (2002). Essential Oils from the Roots of *Thapsia garganica* L. *Journal of Essential Oil Research*. 14(1):20-22.
 26. Azwanida N.N., (2015). A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Medicinal Aromatics Plants*. 4 (196), 2167-0412.
 27. Bajaj Y.P.S., (1995). *Medicinal and Aromatic Plants VIII*; Springer Science & Business Media: Berlin/Heidelberg, Germany. Volume 8.
-

Références

28. Ball M., Andrews S.P., Wierschem F., Cleator E., Smith M.D., Ley S.V., (2007). Total Synthesis of Thapsigargin, a Potent SERCA Pump Inhibitor. *Org. Lett.*, 9, 663–666.
 29. Banasiak L., Piwczyn'ski M., Ulinski T., Downie S.R., Watson M.F., Shakya B., Spalik K., (2013). Dispersal patterns in space and time: a case study of Apiaceae subfamily Apioideae. *Journal of Biogeography*. 40: 1324–1335.
 30. Bedjou F., Berry Y., Bougoffa K., (2011). Etude de la toxicité de *Thapsia garganica* in vivo. 2ème Séminaire International sur les Plantes Médicinales SIPM'2. 30.
 31. Bellakhdar J., (1997). La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle : Médecine Arabe Ancienne et Savoirs Populaires. Ed.Le Fennec, Casablanca/ Ibis Press, Paris, 764 p.
 32. Bendahou M., Muselli A., Grignon-Dubois M., Benyoucef M., Desjobert J.M., Bernardini J.F., Costa J., (2007). Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. Essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chem.*, 106,132-139.
 33. Benkaci-Ali F., Baaliouamer A., Meklati B.Y., (2006). Kinetic study of microwave extraction of essential oil of *Nigella sativa* L. seeds. *Chromatographia*. 64(3-4), 227-231.
 34. Bertherand E.L., (1857), Notice sur la résine de *Thapsia garganica* et son emploi comme emplâtre révulsif. *J. Méd. Chir. Pharmacol.*, 24, 273–274.
 35. Betancourt A.O., (2008). Analyse, extraction et récupération de poly-3-hydroxybutyrate présente dans la biomasse, thèse doctorat, université du Québec à Montréal. 135p.
 36. Bouchachia C., Benkaci-Ali F., Eppe G., Scholl G., (2017). Effect of different parameters on composition of volatile components of *Myristica fragrans* seeds extracted by hydrodistillation assisted by microwave and head-space solid-phase microextraction *J. Essent. Oil Res.*, 29, 481–493.
 37. Boudghene Stambouli O., Amrani N., (2015). Un angioœdème de topographie bilatérale suite au contact avec une plante *Thapsia garganica*. *Revue Française d'Allergologie*. 55 : 235.
 38. Brennen W.N., Rosen D.M., Wang H., Isaacs J.T., Denmeade S.R., (2012). Targeting carcinoma-associated fibroblasts within the tumor stroma with a fibroblast activation protein-activated prodrug. *J. Natl. Cancer I.*, 104, 1320–1334.
 39. Buchholz K.D., Pawliszyn J., (1993). Determination of phenols by solid-phase microextraction and gas-chromatographic analysis. *Environ. Sci. Technol.*, 27, pp. 2844–2848.
-

Références

40. Calado T., Venancio A., Abrunhosa L., (2014). Irradiation for mold and mycotoxin control: a Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 13, 1049-1061.
 41. Casiglia S., Riccobono L., Bruno M., Rosselli S., Senatore F., (2015). Chemical composition of the essential oil from *Thapsia garganica* L. (Apiaceae) grown wild in Sicily and its antimicrobial activity. *Nat. Prod. Res.*, 5: 1-11.
 42. Cervera M.I., Beltran J., Lopez F.J., Hernandez F., (2011). Determination of volatile organic compounds in water by headspace solid-phase microextraction gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry with triple quadrupole analyzer. *Anal Chim Acta.*, 704(1-2):87-97.
 43. Chai M. K., Guan T. H., (2010). Headspace solid-phase micro-extraction for the evaluation of pesticide residue contents in cucumber and strawberry after washing treatment. *Food Chemistry*. 123(3):760-764.
 44. Chalker-Scott L., Fuchigami L. H., (1989). The role of phenolic compounds in plant stress responses. *Low Temperature Stress Physiology in Crops*. CRC Press, Boca Raton. pp. 67–69, in P. H. Li (ed.).
 45. Chandran S.S., Nan A., Rosen D.M., Ghandehari H., Denmeade S.R., (2007). A prostate-specific antigen-activated N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymer prodrug as dual-targeted therapy for prostate cancer. *Mol. Cancer Ther.*, 6, 2928–2937.
 46. Chemat F., Lucchesi M.E., Smadja J., Favretto L., Colnaghi G., Visinoni F., (2006). Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: A rapid, clean and environmentally friendly approach. *Anal. Chim. Acta.*, 555,157-160.
 47. Chemat F., 2015. *Eco-Extraction des produits naturels : procédés innovants et solvants alternatifs*. DUNOD.336 p.
 48. Chibani S., Al-Dabbas M., Abuhamdah S., Aburjai T., Bencheraiet R., Kabouche A., Jay M., Kabouche Z., (2014). Flavonoids and antioxidant activity of *Thapsia garganica* from Algeria. *Chem. Nat. Compd.*, 50:357–359.
 49. Christensen SB, Rasmussen U, Christophersen C., (1980). Thapsigargin, constitution of a sesquiterpene lactone histamine liberator from *Thapsia garganica*. *Tetrahedron Lett.*, 21:3829–30.
 50. Christensen S.B., Larsen I.K., Rasmussen U., Christophersen C., (1982). Thapsigargin and thapsigargin, two histamine liberating sesquiterpene lactones from *Thapsia garganica*. X-ray analysis of the 7,11-epoxide of thapsigargin. *J. Org. Chem.*, 47:649–52.
-

Références

51. Christensen S.B., Norup E., (1985). Absolute configuration of the histamine liberating sesquiterpene lactones thapsigargin and trilobolide. *Tetrahedron Lett.*, 26:107–11.
 52. Christensen S.B., Andersen A., Poulsen J.-C.J., Treiman M., (1993). Derivatives of thapsigargin as probes of its binding site on endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase: Stereoselectivity and important functional groups. *FEBS Lett.*, 335, 345–348.
 53. Christensen S.B., Andersen A., Smitt U.W., (1997). Sesquiterpenoids from *Thapsia* species and medicinal chemistry of the thapsigargines *fortschritte der chemie organischer naturstoffe*. *Prog. Chem. Organ. Nat. Prod.*, 71:129–167.
 54. Christensen S.B., Andersen A., Kromann H., Treiman M., Tombal B., Denmeade S., Isaacs J.T., (1999). Thapsigargin analogues for targeting programmed death of androgenin dependent prostate cancer cells. *Bioorg. Med. Chem.*, 7, 1273–1280.
 55. Christensen S.B., Skytte D.M., Denmeade S.R., Dionne C., Moller J.V., Nissen P., Isaacs J.T., (2009). A Trojan horse in drug development: Targeting of thapsigargines towards prostate cancer cells. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.*, 9, 276–294.
 56. Codex Stan 106-1983 (Rev. 1 – 2003). General standard for irradiated foods. Rome: FAO/WHO Codex Alimentarius Commission, 2003. 10 pp.
 57. Corrales M., Toepf S., Butz P., Knorr D., Tauscher B. (2008). Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 9, 85–91.
 58. Denmeade S.R., Jakobsen C.M., Janssen S., Khan S.R., Garrett E.S., Lilja H., Christensen S.B., Isaacs J.T., (2003). Prostate-specific antigen-activated thapsigargin prodrug as targeted therapy for prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 95:990–1000.
 59. Denmeade S.R., Mhaka A.M., Rosen D.M., Brennen W.N., Dalrymple S., Dach I., Olesen C., Gurel B., Demarzo A.M., Wilding G., Carducci M.A., Dionne C.A., Møller J.V., Nissen P., Christensen S.B., Isaacs J.T., (2012). Engineering a prostatespecific membrane antigen-activated tumor endothelial cell prodrug for cancer therapy. *Sci. Transl. Med.*: 4(140):140ra86.
 60. Dharmawan J., Kasapis S., Sriramula P., Lear M.J., Curran P., (2008). Evaluation of Aroma-Active Compounds in Pontianak Orange Peel Oil (*Citrus nobilis* Lour. Var. *microcarpa* Hassk.) by Gas Chromatography–Olfactometry, Aroma Reconstitution, and Omission Test. *Journal of agricultural and food chemistry*. 57 (1), 239-244.
-

Références

61. Directive 1999/3/EC of the European Parliament and of the Council of 22 February 1999 on the establishment of a Community list of foods and food ingredients treated with ionising radiation. Official Journal of the European Communities, L 66, 1999, pp. 24–25.
 62. Djeridane A., Yousfi M., Brunel J.M., Stocker P., (2010). Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. Food and Chemical Toxicology. 48, 2599–2606.
 63. Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N., (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food chemistry. 97(4), 654-660.
 64. Doan N.T., Paulsen E.S., Sehgal P., Moller J.V., Nissen P., Denmeade S.R., Isaacs J.T., Dionne C.A., Christensen S.B., (2014.) Targeting thapsigargin towards tumors. Steroids. 97, 27.
 65. Drew D.P., Krichau N, Reichwald K., Simonsen H.T., (2009). Guaianolides in Apiaceae: Perspectives on pharmacology and biosynthesis. Phytochemistry Reviews 8(3), 581-599.
 66. Drew D.P., Rasmussen S.K., Avato P., Simonsen H.T., (2012). A comparison of headspace solid-phase microextraction and classic hydrodistillation for the identification of volatile constituents from *Thapsia spp.* provides insights into guaianolide biosynthesis in Apiaceae. Phytochemical Analysis. 23(1), 44-51.
 67. Dumoulin M., Barthas S., 2006. Applications courantes de la Micro-Extraction en Phase Solide (SPME) à l'analyse des vins. Revue des Œnologues n°119 HS Laboratoire Exact Mâcon -France.
 68. Dumoulin M., Riboulet J.M., Barthas S., Alves L., (2014). Applications de la Micro Extraction en Phase Solide (SPME) pour la maîtrise de la qualité et de la sécurité des vins.
 69. Elmezogi J., Zetrini A., Ben-Hussein G., Anwair M., Gbaj A., El-Ashheb M., Nahar L., Sarker Satyajit D., (2012). Evaluation of anti-inflammatory activity of some libyan medicinal plants in experimental animals. Arch. Biol. Sci., Belgrade, 64 (3), 1059-1063.
 70. Falsone G., Haddad H., Wendisch D., (1986). Sesquiterpenelactone triesters with unusual structures from *Thapsia garganica* L. (umbelliferae). Arch. Pharm. 319, 372–379.
 71. Farkas J., Mohàcsi-Farkas C., (2011). History and future of food irradiation. Trends Food Sci.Tech. 22, 121-126.
-

Références

72. Ferreira-Castro F.L., Aquino S., Greiner R., Ribeiro D.H., Reis T.A., Correa B., (2007). Effects of gamma radiation on maize samples contaminated with *Fusarium verticillioides*. *Appl. Radiat. Isot.*, 65, 927-933.
 73. Fett-Neto A.G., (2010). *Plant Secondary Metabolism Engineering*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany.
 74. Flamini G., Tebano M., Cioni P.L., Ceccarini L., Ricci A.S., Longo I., (2007). Comparison between the conventional method of extraction of essential oil of *Laurus nobilis L.* and a novel method which uses microwaves applied in situ, without resorting to an oven. *J. Chromatogr. A.* 1143, 36-40.
 75. Fraga B. M., (2011). Natural sesquiterpenoids. *Nat. Prod. Rep.*, 28, 1580-1610.
 76. Gardeli C., Vassiliki P., Athanasios M., Kibouris T., Komaitis M., (2008). Essential oil composition of *Pistacia lentiscus L.* and *Myrtus communis L.*: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chem.*, 107: 1120-1130.
 77. Genspera Genspera, Inc. Available online: <http://www.genspera.com> (accessed on 17 February 2015).
 78. Gerard J., (1597). *The Herball, or, Generall historie of plantes, gathered by John Gerarde of London, Master in Chirurgie, Imprinted at London and enlarged and emended by Thomas Johnson.*
 79. Grayer R.J., Chase M.W., Simmonds M.S.J., (1999). A comparison between chemical and molecular characters for the determination of phylogenetic relationships among plant families, *Biochem. Syst. Ecol.*, 27 (4), 369-393.
 80. Grolichova M., Dvorak P., Musilova H., (2004). Employing ionizing radiation to enhance food safety e a review. *Acta.Vet. Brno.*, 73, 143-149.
 81. Gurib-Fakim A., (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow, *Molecular Aspects of Medicine.* 27, 1-93.
 82. Guzmán-Gerónimo R.I., López M.G., Dorantes-Alvarez L., (2008). Microwave processing of avocado: volatile flavor profiling and olfactometry, *Innovative Food Sci. Eng. Technol.*, 9, 501-506.
 83. Gyawali R., Seo H.Y., Lee H.J., Song H.P., Kim D., Byun M.W., Kim K.S., (2006). Effect of γ -irradiation on volatile compounds of dried Welsh onion (*Allium fistulosum L.*). *Radiation Physics and Chemistry.* 75(2):322-328.
-

Références

84. Hakii H., Fujiki H., Suganuma M., Nakayasu M., Tahira T., Sugimura T., Scheuer P.J., Christensen S.B., (1986). Thapsigargin, a histamine secretagogue, is a non-12-Otetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) type tumor promoter in two-stage mouse skin carcinogenesis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 111:177–81.
 85. Hammiche V., (1991). Pathologie hivernale et pharmacopée traditionnelle dans les montagnes kabyles. 3ème séminaire national sur les ressources phytogénétiques, Alger 17-18 juin.
 86. Hammiche V., (2015). Traitement de la toux à travers la pharmacopée traditionnelle kabyle. *Phytothérapie* 13(6), 358-372.
 87. Harmatha J., Budesinsky M., Vokac K., Kostecka P., Kmonickova E., Zidek Z., (2013). Trilobolide and related sesquiterpene lactones from *Laser trilobum* possessing immunobiological properties. *Fitoterapia*. 89C:157–66.
 88. Hassen I., M'Rabet Y., Belgacem C., Kesraoui O., Casabianca H, Hosni K., (2015). Chemodiversity of volatile oils in *Thapsia garganica* L. (Apiaceae). *Chem Biodivers.*, 12:637–651.
 89. Holub M., Samek Z., deGroote R., Herout V., Sorm F., (1973). On terpenes. CCXXVII. The structure of the sesquiterpene triester lactone trilobolide. *Collect Czech. Chem. Commun.*, 38:1551–62.
 90. Ikezawa N., Göpfert J.C., Nguyen D.T., Kim S.-U., O'Maille P.E., Spring O., Ro D.-K., (2011). Lettuce Costunolide Synthase (CYP71BL2) and Its Homolog (CYP71BL1) from Sunflower Catalyze Distinct Regio- and Stereoselective Hydroxylations in Sesquiterpene Lactone Metabolism. *J. Biol. Chem.*, 286, 21601–21611.
 91. Isaacs J.T., (2005). New strategies for the medical treatment of prostate cancer. *BJU International Suppl 2*: 35-40
 92. Jäger A.K., Gudiksen L., Adsersen A., Smitt U.V., (1993a). High-performance liquid chromatography of thapsigargin. *J. Chromatogr. A*. 634: 135-7.
 93. Jäger A.K., Schottländer B., Smitt U.W., Nyman U., (1993b). Somatic embryogenesis in cell cultures of *Thapsia garganica*. *Plant Cell Rep.*, 12, 517–520.
 94. Jalili M., (2016). A Review of Aflatoxins reduction in food. *Iran. J. Health Saf. Environ.*, 3, 445-459.
 95. Jay M., Lumaret R. (1995). Variation in the subtropical group of *Dactylis glomerata* L. 2. Evidence from phenolic compound patterns. *Biochem. Syst. Ecol.*, 23:523–531.
-

Références

96. Jemmali M.P., Guilbot A., (1970). Influence of gamma irradiation on the tendency of *A. flavus* spores to produce toxins during culture. *Food Irrad.*, 10, 15-19.
 97. Jetli R.R., Yang E., Kurnianta A., Finn C., Qian M.C., (2007). Quantification of selected aroma-active compounds in strawberries by headspace solid-phase microextraction gas chromatography and correlation with sensory descriptive analysis. *J. Food Sci.*, 72, S487–S496.
 98. Kaiser R., (2007). The Scents of Endangered Plants around the World, Perspectives in Flavor and Fragrance Research. 1, 15–29.
 99. Kaliappan K.P., Nandurdikar R.S., (2005). A facile domino metathetic route to a thapsigargin skeleton. *Org. Biomol. Chem.*, 3, 3613–3614.
 100. Kirkin C., Mitrevski B., Gunes G., Marriott P.J., (2014). Combined effects of gamma irradiation and modified atmosphere packaging on quality of some spices. *Food Chemistry*. 154, 255-261.
 101. Kmonickova E., Melkusova P., Harmatha J., Vokac K., Farghali H., Zidek Z., (2008). Inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase thapsigargin stimulates production of nitric oxide and secretion of interferon-gamma. *Eur J. Pharmacol.*, 588:85–92.
 102. Kraujalyte V., Leitner E., Venskutonis P.R., (2012). Chemical and sensory characterisation of aroma of *Viburnum opulus* fruits by solid phase microextraction-gas chromatography-olfactometry. *Food Chem.* 132, 717–723.
 103. Ladjel S., Zellagui A., Gherraf N., (2011). Reinvestigation of essential oil content of *Thapsia garganica* grown in the east of Algeria. *J. Fundam. Appl. Sci.*, 3: 165-168.
 104. Laska M., Hudson, R. (1993a). Assessing olfactory performance in a New World primate, *Saimiri sciureus*. *Physiology & Behavior*. 53, 89-95.
 105. Laska M., Hudson, R. (1993b). Discriminating parts from the whole: Determinants of odor mixture perception in squirrel monkeys, *Saimiri sciureus*. *Journal of Comparative Physiology A*. 173, 249-256.
 106. Ley S.V., Antonello A., Balskus E.P., Booth D.T., Christensen S. B., Cleator E., Gold H., Högenauer K., Hü nger U., Myers R.M., Oliver S.F., Simic O., Smith M. D., Søhoel H., Woolford A. J. A., (2004). Synthesis of the thapsigargin. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 101, 12073-12078.
 107. Liu H., Olsen C.E., Christensen S.B., (2004). Tethered lipids from *Thapsia garganica*. *J. Nat. Prod.*, 67:1339–40.
-

Références

108. Liu H.Z., Jensen K.G., Tran L.M., Chen M., Zhai L., Olsen C.E., Søhoel H., Denmeade S.R., Isaacs J.T., Christensen S.B., (2006). Cytotoxic phenylpropanoids and an additional thapsigargin analogue isolated from *Thapsia garganica*. *Phytochemistry* 67(24):2651–2658.
 109. Liu Q., Majdi M., Cankar K., Goedbloed M., Charnikhova T., Verstappen F.W., de Vos R.C., Beekwilder J., Van der Krol S., Bouwmeester H.J., (2011). Reconstitution of the costunolide biosynthetic pathway in yeast and *Nicotiana benthamiana*. *PLoS ONE*, 6(8):e23255.
 110. Lord H., Pawliszyn, J., (2000). Evolution of solid-phase microextraction technology (review). *Journal of Chromatography A*. 885, 153–193.
 111. Louch D.S., Motlagh S., Pawliszyn J., (1992). Dynamics of Organic Compound Extraction from water using liquid-coated FusedSilica Fibers. *Anal. Chem.*, 64, 1187-1199.
 112. Lu Y.R., Foo L.Y., (2001). Salvianolic acid L, a potent phenolic antioxidant from *Salvia officinalis*. *Tetrahedron Lett.*, 42:8223-8225.
 113. Lucchesi M.E., Chemat F., Smadja J., (2004). Solvent free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: Comparison with conventional hydro-distillation. *J. Chromatogr. A*. 1043, 323-327.
 114. Lucchesi M. E., (2005). Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. Université de la Réunion.
 115. Lucchesi M.E., Smadja J., Bradshaw S., Louw W., Chemat F., (2007). Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum L.*: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. *J. Food Engineer.*, 79,1079-1086.
 116. Mahalingam D., Cetnar J., Wilding G., Denmeade S., Sarantopoulos J., Kurman M., Carducci M., (2013). A first-in-human phase 1 clinical study of G-202, a thapsigargin-based Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) activated prodrug, in patients with advanced solid tumors. *Mol. Cancer Ther.*, 12, B244–B244.
 117. Makunga N.P., Jäger A.K., van Staden J., (2003). Micropropagation of *Thapsia garganica*- a medicinal plant. *Plant Cell Rep.*, 21, 967–973.
 118. Makunga N.P., Jäger A.K., van Staden J., (2005). An improved system for the in vitro regeneration of *Thapsia garganica* via direct organogenesis–influence of auxins and cytokinins. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* , 82, 271–280.
-

Références

119. Makunga N.P., Jäger A.K., van Staden J., (2006). Improved in vitro rooting and hyperhydricity in regenerating tissues of *Thapsia garganica* L., Plant Cell Tissue Organ Cult., 86, 77–86.
 120. Malla S.S., Diehl J.F., Salunkhe D.K., (1967). In vitro susceptibility of strains of *Penicillium viridcatum* and *Aspergillus flavus* to beta-irradiation. *Experientia*. 23, 492-493.
 121. Marín-Barrios R., García-Cabeza A.L., Moreno-Dorado F.J., Guerra F.M., Massanet G.M., (2014). Acyloxylation of Cyclic Enones: Synthesis of Densely Oxygenated Guaianolides. *J. Org. Chem.*, 79, 6501–6509.
 122. Mastroianni A., Vayena E., Kahn J., (2012). Ethical issues in health research with novel online sources, *Am. J. Public Health*. 102(12): 2225–2230.
 123. Mengel P., Beh D., Bellido G.M., Monpon B., (1993). VHMD: extraction d'huile essentielle par micro-ondes. *Parfums Cosmétiques Arômes*. 114, 66-67.
 124. Merad R., (1973). Contribution à la connaissance de la pharmacopée traditionnelle algérienne. Les eventaires du Grand-Alger. These de Doctorat d'Etat en Pharmacie, universite d'Alger.
 125. Merad R., Hammiche V., (1992). The inventory of toxic plants of Algeria. *Recent advances in toxinology research*. 3: 7-11.
 126. Mikkelsen E.O., Thastrup O., Christensen S.B., (1988). Effects of thapsigargin in isolated rat thoracic aorta. *Pharmacol. Toxicol.*, 62:7–11.
 127. Milhome M. A. L., Sousa P. L. R., De Keukeleire D., Nascimento R.F., (2011). Multiresidue methods for determination of pesticides using SPME and SPE followed by GC-NPD system: a comparative study. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 22(11):2048-2055.
 128. Norup E, Smitt UW, Christensen SB. The potencies of thapsigargin and analogues as activators of rat peritoneal mast cells. *Planta Med* 1986:251–5.
 129. Oliver S. F., Högenauer K., Simic O., Antonello A., Smith M. D., Ley S. V., (2003). A route to the thapsigargin from (S)-carvone providing a substrate-controlled total synthesis of trilobolide, nortrilobolide, and thapsivillosin F. *Angew. Chem. Int., Ed. Engl.*, 42(48):5996-6000.
 130. Ollivier A., Grougnet R., Cachet X., Meriane D., Ardisson J. Boutefnouchet S., Deguin B., (2013). Large scale purification of the SERCA inhibitor Thapsigargin from *Thapsia garganica* L. roots using centrifugal partition chromatography. *J. Chromatogr. B*. 926, 16–20.
-

Références

131. O'Neill K., Damaglou A.P., Patterson M.F., (1996). The influence of gamma radiation and substrate on mycotoxin production by *Fusarium culmorum* IMI 309344. *J. Appl. Bacteriol.*, 81, 518-524.
 132. Ouarghidi A., Powell B., Martin G., de Boer H. Abbad A., (2012). Species Substitution in Medicinal Roots and Possible Implications for Toxicity of Herbal Remedies in Morocco. *Econ. Bot.*, 66, 370–382.
 133. Owczarczyk H.B, Migdal W., Kedzia B., (2000). The pharmacological activity of medical herbs after microbiological decontamination by irradiation. *Radiat. Phys. Chem.*, 57(3-6):331–335.
 134. Paige Stout E., Kubanek J., (2010). Natural Products Structural Diversity-II Secondary Metabolites: Sources, Structures and Chemical Biology. In *Comprehensive Natural Products II*. 2, 41–65.
 135. Pan X.-W. (2014). Metabolic Engineering of the Diterpenoid Sclareol in the Moss *Physcomitrella Patens*. Ph.D. Thesis, University of Copenhagen: Copenhagen, Denmark.
 136. Patkar S.A., Rasmussen U., Diamant B., (1979). On the mechanism of histamine release induced by thapsigargin from *Thapsia garganica* L. *Agents Actions*. 9: 53–7.
 137. Pérez-Gordones M.C., Serrano M.L., Rojas H., Martínez J.C., Uzcanga G., Mendoza M., (2015). Presence of a thapsigargin-sensitive calcium pump in *Trypanosoma evansi*: Immunological, physiological, molecular and structural evidences. *Experimental Parasitology*. 159:107-117.
 138. Perrot E., (1943). *Matière Première usuelle du Règne Végétale*. Paris : Masson et cie., 1630-2.
 139. Phillips O., Gentry A.H., (1993). The useful plants of *Tambopata Peru*: I. Statistical hypothesis tests with a new quantitative technique. *Econ. Bot.*, 47:15–32.
 140. Pickel B., Drew D.P., Manczak T., Weitzel C., Simonsen H.T., Ro D.K., (2012). Identification and characterization of a kunzeaol synthase from *Thapsia garganica*: Implications for the biosynthesis of the pharmaceutical thapsigargin. *Biochem. J.*, 448, 261–271.
 141. Polovka M., Suhaj M., (2013). Classification and prediction of γ -irradiation of ten commercial herbs and spices by multivariate evaluation of properties of their extracts. *J. Food Nutr. Res.*, 52, pp. 45–60
 142. Proestos C., Komaitis M., (2008). Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. *LWT-Food Science and Technology*. 41, 652-659.
-

Références

143. Quezel P., Santa S., (1962-1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS, Paris.
 144. Rached W., Benamar H., Bennaceur M., Marouf A., (2010). Screening of the antioxidant potential of some Algerian indigenous plants. *J. Biol. Sci.*, 10(4): 316-324.
 145. Rasmussen U., Christensen S.B., Sandberg F., (1978). Thapsigargin and thapsigarginine, two new histamine liberators from *Thapsia garganica*. *Acta. Pharm. Suec.*, 15: 133-40.
 146. Rasmussen U., (1979). Farmakognostiske Undersøgelser af Slægten *Thapsia* L. Ph.D. Thesis, Danmarks Farmaceutiske Højskole, Copenhagen, Danmarks.
 147. Rufino A.T., Ferreira I., Judas F., Salgueiro L., Lopes M.C., Cavaleiro C., Mendes A.F., (2015). Differential effects of the essential oils of *Lavandula luisieri* and *Eryngium duriaei subsp. juresianum* in cell models of two chronic inflammatory diseases. *Pharm Biol.*, 53:1220-1230.
 148. Sagara Y., Inesi G., (1991). Inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ transport ATPase by thapsigargin at subnanomolar concentrations. *J. Biol. Chem.*, 266, 13503–13506.
 149. Sagara Y., Fernandez-Belda F., de Meis L., Inesi G., (1992). Characterization of the inhibition of intracellular Ca²⁺ transport ATPases by thapsigargin. *J. Biol. Chem.* 267, 12606-12613.
 150. Scalzo J., Politi A., Pellegrini N., Mezzetti B., Battino M., (2005). Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. *Nutrition.* 21(2), 207-213.
 151. Schall A., Reiser O., (2008). Synthesis of biological active guaianolides with a transannulated lactone moiety. *Eur. J. Org. Chem.*, 2353-2364.
 152. Seo H-Y., Kim J-H., Song H-P., Kim D-H., Byun M-W., Kwon J-H., Kim K-S., (2007). Effects of gamma irradiation on the yields of volatile extracts of *Angelica gigas Nakai*. *Radiation Physics and Chemistry.* 76(11), 1869-1874.
 153. Shah M.A., Mir S.A., Pala S.A., (2014). Enhancing food safety and stability through irradiation: a review. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.*, 3, 371-378.
 154. Shukla N., Wan S., Angelini G.D., Jeremy J.Y., (2013). Low nanomolar thapsigargin inhibits the replication of vascular smooth muscle cells through reversible endoplasmic reticular stress. *European Journal of Pharmacology.* 714:210–217.
 155. Silva J., Barrandon O., Nichols J., Kawaguchi J., Theunissen T.W., Smith A., (2008). Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS Biol.*, 6(10):e253.
-

Références

156. Simonsen H.T., Drew D.P., Lunde C., (2009). Perspectives on Using *Physcomitrella Patens* as an Alternative Production Platform for Thapsigargin and Other Terpenoid Drug Candidates. *Perspect. Med. Chem.*, 3, 1–6.
157. Simonsen H.T., Weitzel C., Christensen S.B., (2013). Guaianolide sesquiterpenoids: Their pharmacology and biosynthesis. In *Handbook of Natural Products Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*; Ramawat, K.G., Merillon, J.M., Eds.; Springer-Verlag: Berlin, Germany. pp. 3069–3098.
158. Singh R., Singh S.K., Arora S., (2007). Evaluation of antioxidant potential of ethyl acetate extract/fractions of *Acacia auriculiformis* A. Cunn. *Fod. Chem. Toxicol.*, 45, 1216-1223.
159. Smith J.S., Pillai S., (2004). Irradiation and food safety. *Food Technol.*, 58, 48-55.
160. Smitt U.W., Jäger A.K., Adersen A., Gudiksen L., (1995). Comparative studies in phytochemistry and fruit anatomy of *Thapsia garganica* and *T. transtagana*, Apiaceae (Umbelliferae). *Botanical Journal of the Linnean Society*. 117(4), 281-292.
161. Snow N. H., (2002). Head-space analysis in modern gas chromatography, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 21 (9-10), 608–617.
162. Søhoel H., Liljefors T., Ley S.V., Oliver S.F., Antonello A., Smith M.D., Olsen C.E., Isaacs J.T., Christensen S.B., (2005). Total synthesis of two novel subpicomolar sarco/endoplasmatic reticulum Ca²⁺-ATPase inhibitors designed by an analysis of the binding site of thapsigargin. *J. Med. Chem.*, 48, 7005–7011.
163. Søhoel H., Jensen A.M.L., Møller J.V., Nissen P., Denmeade S.R., Isaacs J.T., Olsen C.E., Christensen S.B., (2006). Natural products as starting materials for development of second-generation SERCA inhibitors targeted towards prostate cancer cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 14(8), 2810-2815.
164. Sommer N.F., Fortlage R.J., (1966). Ionizing radiation for control of postharvest diseases of fruits and vegetables. *Adv. Food Res.*, 15, 147-193.
165. Sporkert F., Pragst F., (2000). Determination of lidocaine in hair of drug fatalities by headspace solid-phase microextraction. *J. Anal. Toxicol.*, 24(5):316-22.
166. Stepp J.R., Moerman D.E., (2001). The importance of weeds in ethnopharmacology. *J. Ethnopharmacol.*, 75:19–23.
167. Tap A., Jouanneau M., Galvani G., Sorin G., Lannou M.-I., Férézou J.-P., Ardisson J., (2012). Asymmetric synthesis of a highly functionalized enantioenriched system close to thapsigargin framework. *Org. Biomol. Chem.*, 10, 8140–8146.
-

Références

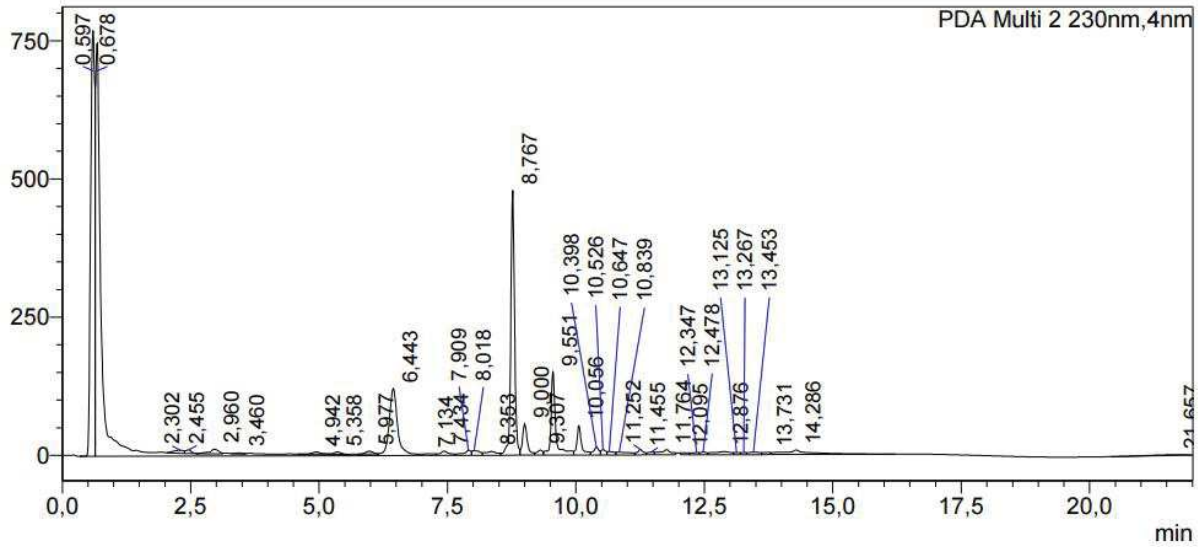
168. Tena M.T., Valcarcel M., Hidalgo P.J., Uberta J.L., (1997). Supercritical fluid extraction of natural antioxidants from rosemary: comparison with liquid solvent sonication. *Analytical Chemistry*. 69: 521–526.
169. Thastrup O., Cullen P.J., Drobak B.K., Hanley M.R., Dawson A.P., (1990). Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*. 87, 2466–2470.
170. Tlili N., Mejri H., Ben Lajnef H., Feriani A., Khaldi A., Nasri N., (2015). Unexploited *Thapsia garganica*, *Orlaya maritima*, and *Retama raetam* Seeds: Potential Sources of Unsaturated Fatty Acid and Natural Antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 92(8)1175–1181.
171. Van Andel T., Mitchell S., Volpato G. et al., (2012). In search of the perfect aphrodisiac: parallel use of bitter tonics in West Africa and the Caribbean. *J. Ethnopharmacol.*, 143:840–850.
172. Van Damme P., 2001. Pesticide, drug and essential oil crops. In: Raemakers RH. *Crop production in tropical Africa*. Brussels, Belgium, Ed. Directorate General for International Cooperation (DGIC)., 1155–1166.
173. Variyar P.S., Gholap A.S., Thomas P., (1997). Effect of γ -irradiation on the volatile oil constituents of fresh ginger (*zingiber officinale*) rhizome. *Food Research International*. 30(1), 41-43.
174. Vas G., Vékey K., (2004). Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *J. Mass Spectrom.*, 39(3):233-54.
175. Vázquez-Araújo L., Chambers E., Funk, D.B., (2011). References for “musty” odor notes in sensory analysis of grain sorghum. *J. Cereal Sci.*, 54: 460-466.
176. Vilkhū K., Mawson R., Simons L., Bates D., (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry -A review. *Innov. Food Sci. Emerg.*, 9:161–169.
177. Villaño D., Fernández-Pachón M. S., Moyá M. L., Troncoso A. M., & García Parrilla M. C., (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*. 71(1), 230–235.
178. Voon Y.Y., Abdul Hamid N.S., Rusul G., Osman A., Quek S.Y., (2007). Characterisation of *Malaysian durian* (*Durio zibethinus* Murr.) cultivars: relationship of physicochemical and flavour properties with sensory properties. *Food Chem*. 103, 1217–1227.
-

Références

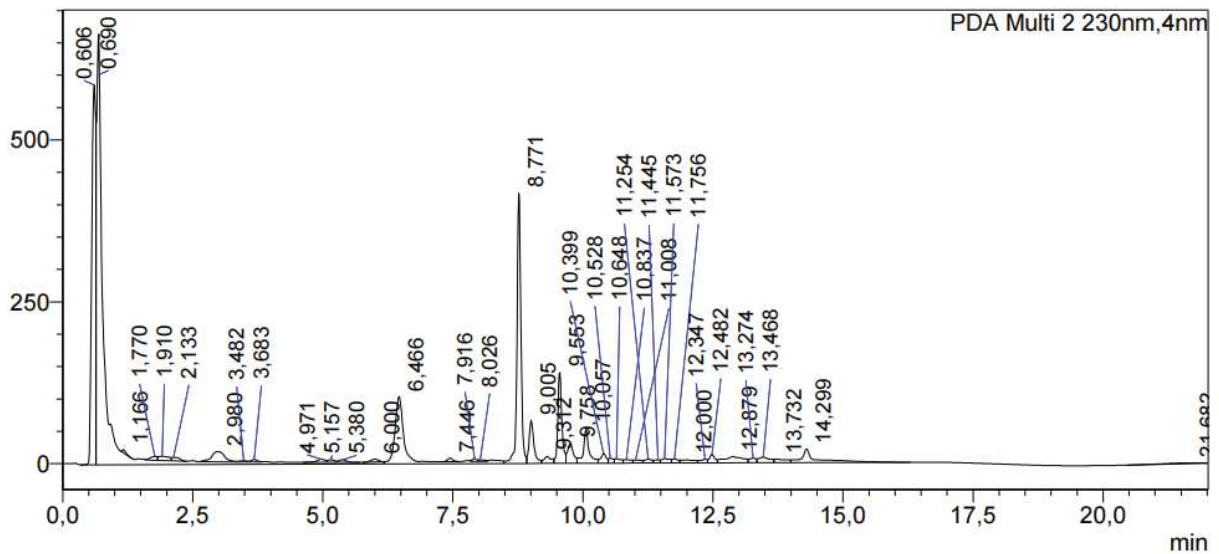
179. Waje C., Kim H.-K., Kim K.-S., Todoriki S, Kwon J-H., (2008). Physicochemical and Microbiological Qualities of Steamed and Irradiated Ground Black Pepper (*Piper nigrum* L.) J. Agric. Food Chem., 56, 4592–4596.
180. Waterman P. G., Mole S., (1994). Analysis of phenolic plant metabolites, p. 231, in J. H. Lawron and G. E. Likens (eds.). Methods in Ecology. Blackwell, Oxford.
181. Weitzel C., Rønsted N., Spalik K., Simonsen H.T., (2014). Resurrecting deadly carrots: towards a revision of *Thapsia* (Apiaceae) based on phylogenetic analysis of nrITS sequences and chemical profiles. Botanical Journal of the Linnean Society. 174(4), 620-636.
182. Wise M.L., Savage T.J., Katahira E., Croteau R., (1998). Monoterpene synthases from common sage (*Salvia officinalis*)—cDNA isolation, characterization, and functional expression of (+)-sabinene synthase, 1,8-cineole synthase, and (+)-bornyl diphosphate synthase. J. Biol. Chem., 273, 14891–14899.
183. Wrzosek A., Schneider H., Grueninger S., Chiesi M., (1993). Effect of thapsigargin on cardiac muscle cells. Cell Calcium 13: 281-92.
184. Yalcin H., Ozturk I., Tulukcu E., Sagdic O., (2011). Effect of γ -irradiation on bioactivity, fatty acid compositions and volatile compounds of clary sage seed (*Salvia sclarea* L.). J. Food Sci., 76(7), 1056-61.
185. Yu Y.B., Jeong I.Y., Park H.R., Oh H., Jung U., Jo S.K., (2004). Toxicological safety and stability of the components of an irradiated Korean medicinal herb, *Paeoniae Radix*. Radiation Physics and Chemistry. 71(1-2):117-121.
186. Zervakis G. I. et al., (2001). Genetic polymorphism and taxonomic infrastructure of the *Pleurotus eryngii* species complex as determined by RAPD analysis, isozyme profiles and ecomorphological characters Microbiology. 147, 3183–3194.
187. Zhang Z., Pawliszyn J., (1993). Headspace solid-phase microextraction. Analytical chemistry. 65 (14), 1843-1852.
-

Anneses

Annexes

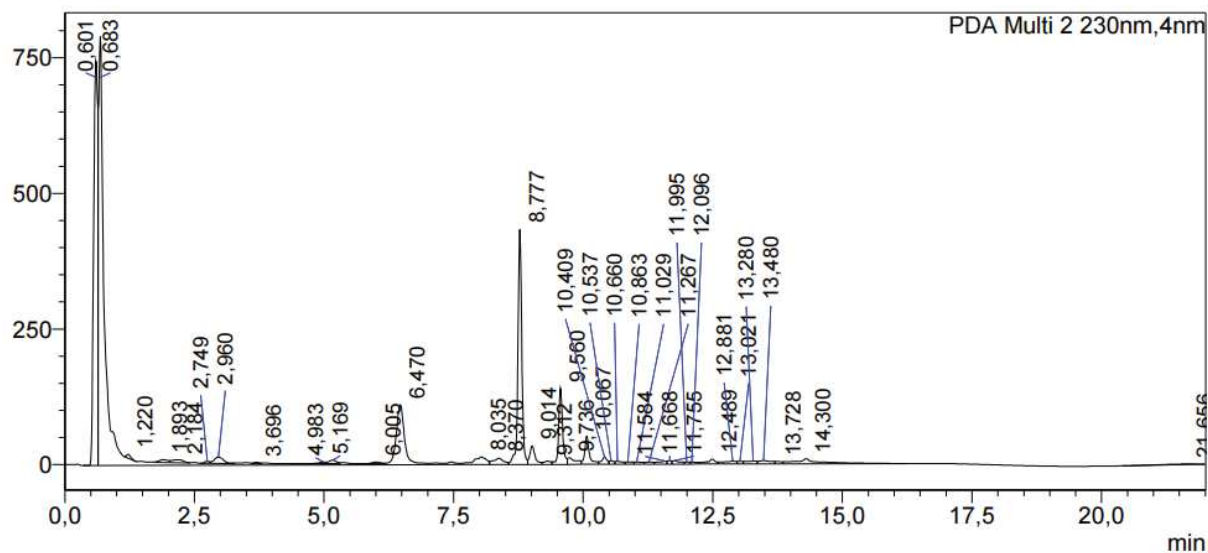


Annexe 1 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de feuilles de Bejaia non traitées par rayon gamma

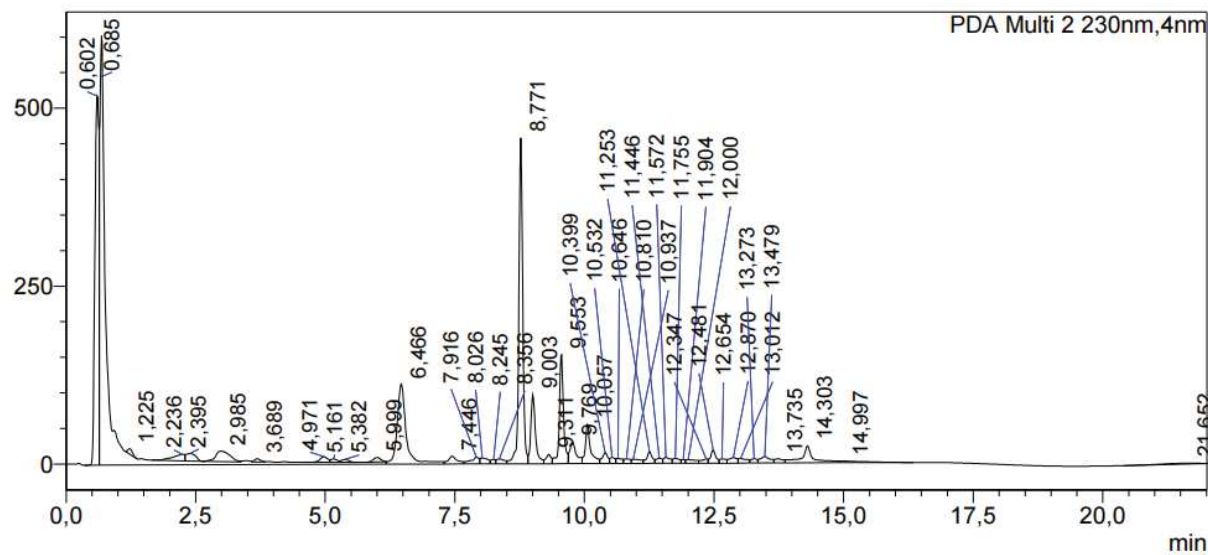


Annexe 2 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de feuilles de Bejaia traitées à 10KGy

Annexes

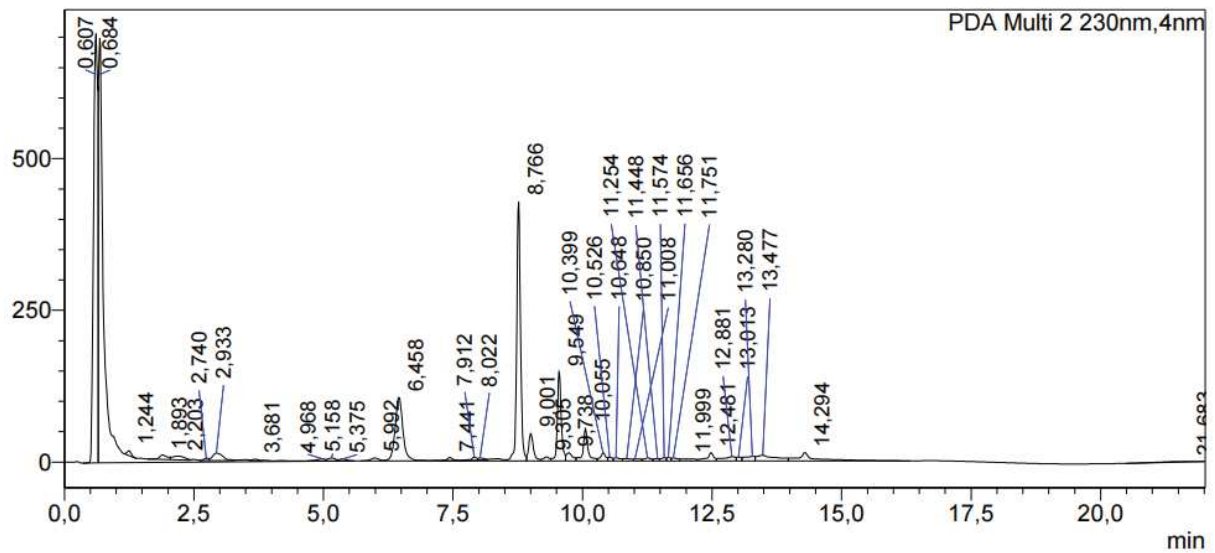


Annexe 3 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de feuilles de Bejaïa obtenues par microondes et traitées à 10KGy

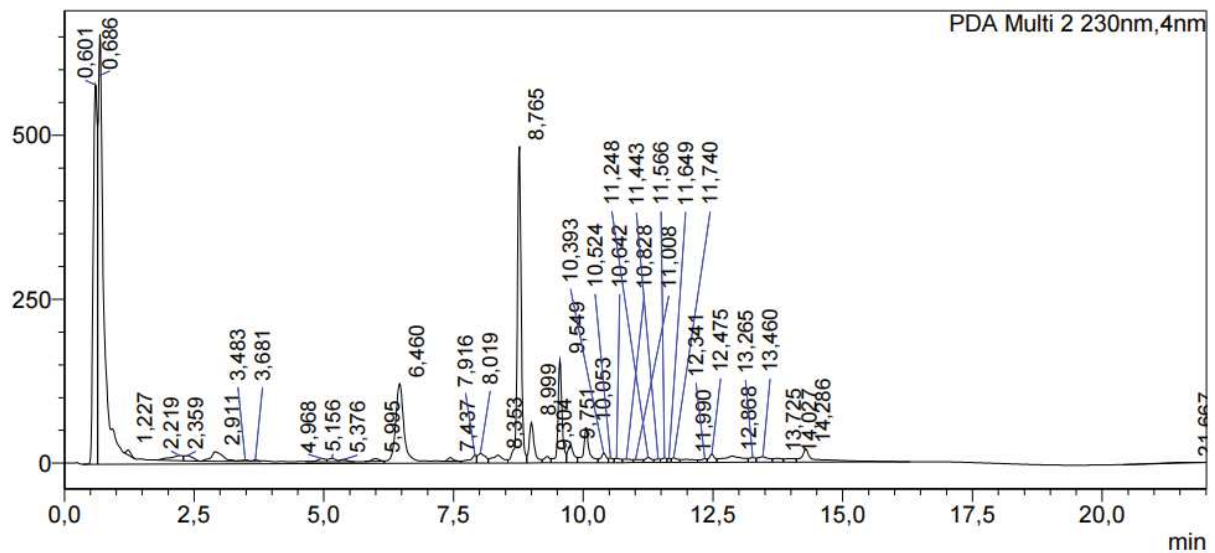


Annexe 4 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de feuilles de Béjaia traitées à 7 KGy

Annexes

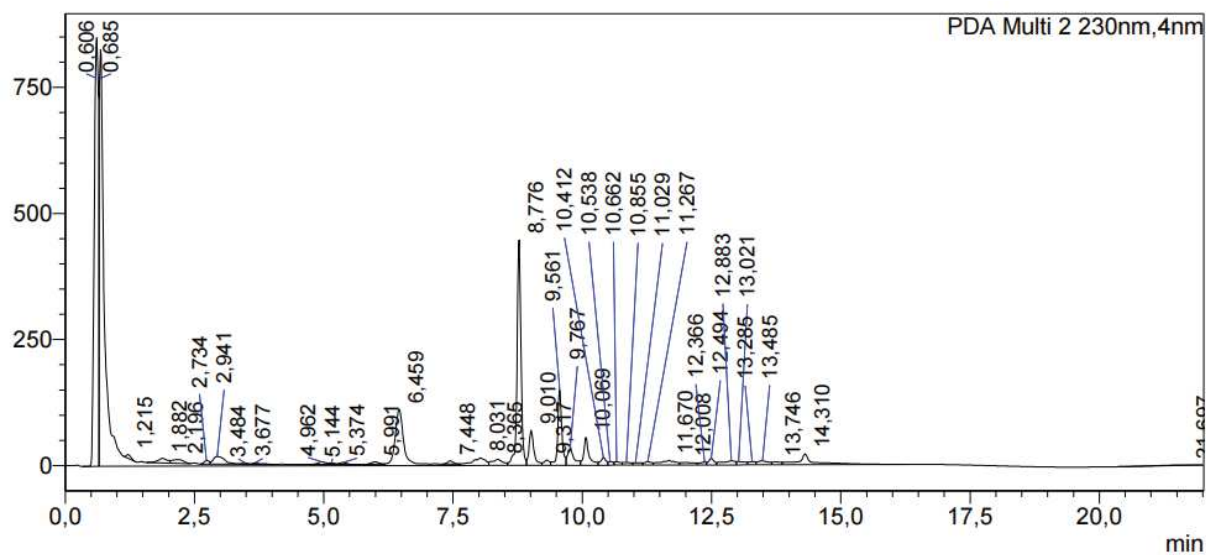


Annexe 5 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de feuilles de Bejaia obtenues par microondes et traitées à 7KGy

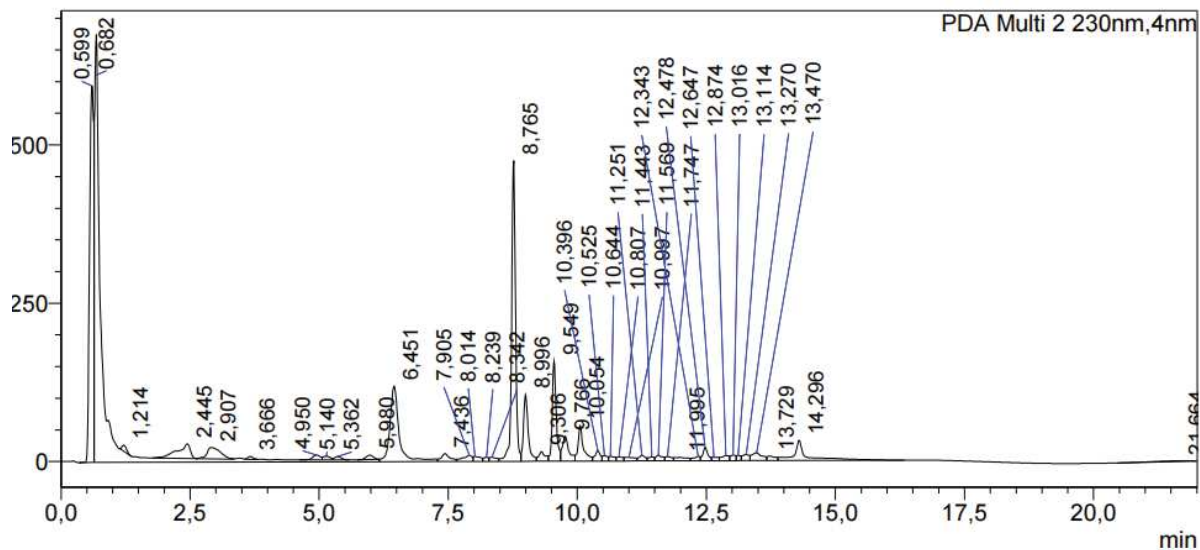


Annexe 6 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de feuilles de Béjaia traitées à 3 KGy

Annexes

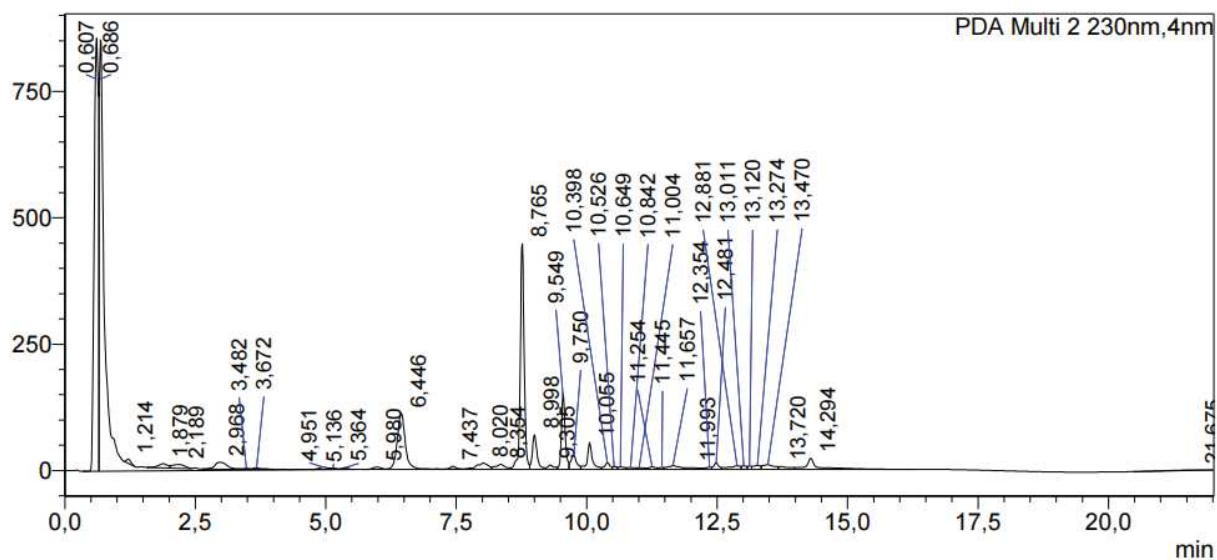


Annexe 7 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de feuilles de Bejaia obtenues par microondes et traitées à 3 KGy

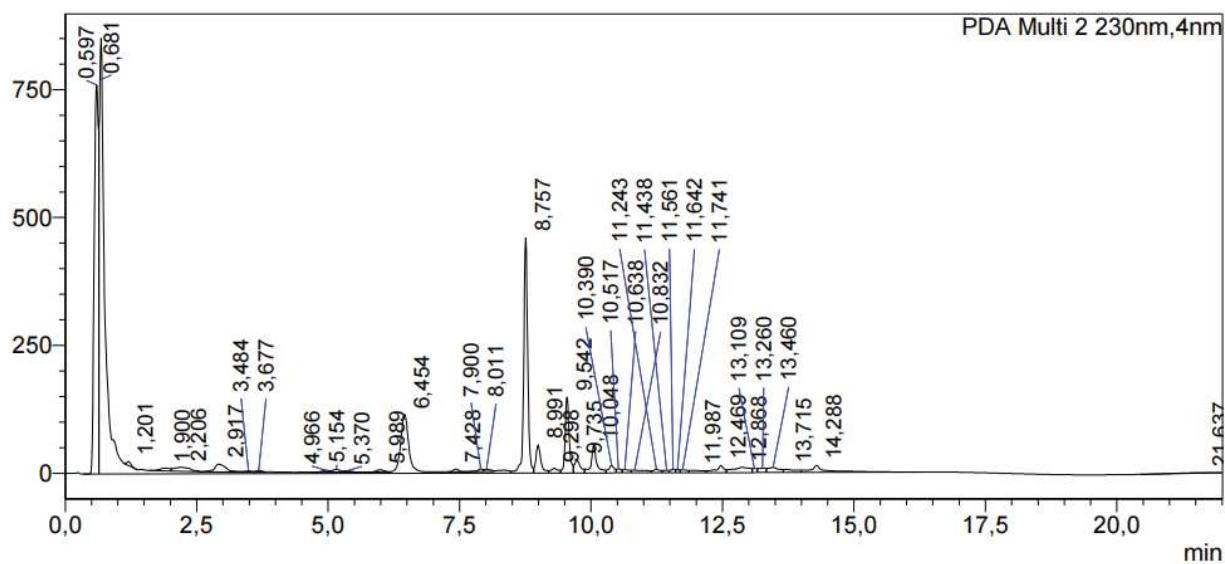


Annexe 8 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de feuilles de Béjaia traitées à 1KGy

Annexes

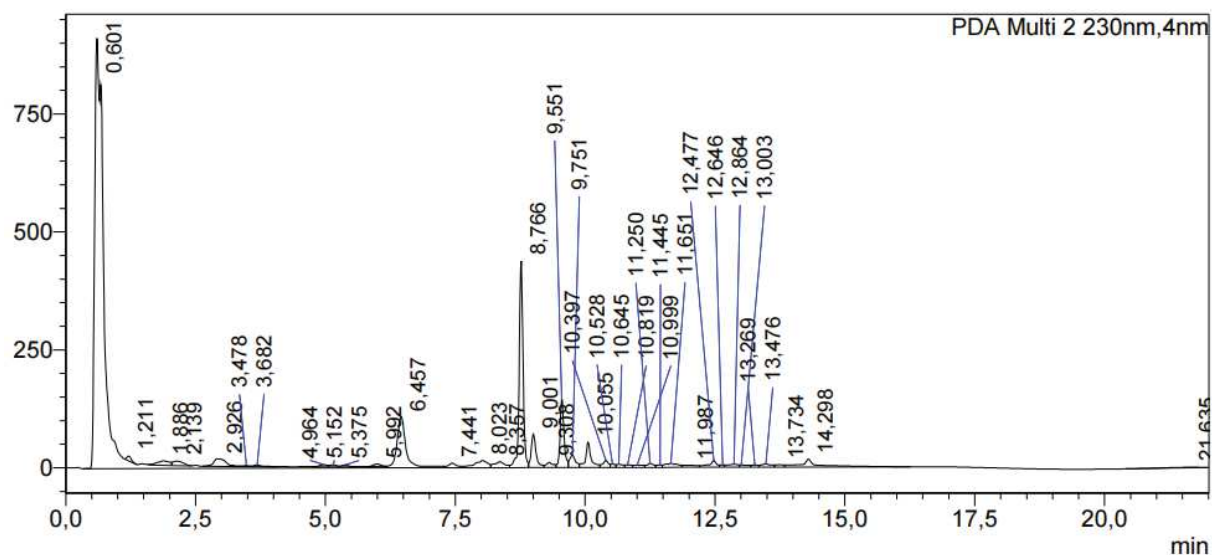


Annexe 9 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de feuilles de Bejaia obtenues par microondes et traitées à 1 KGy

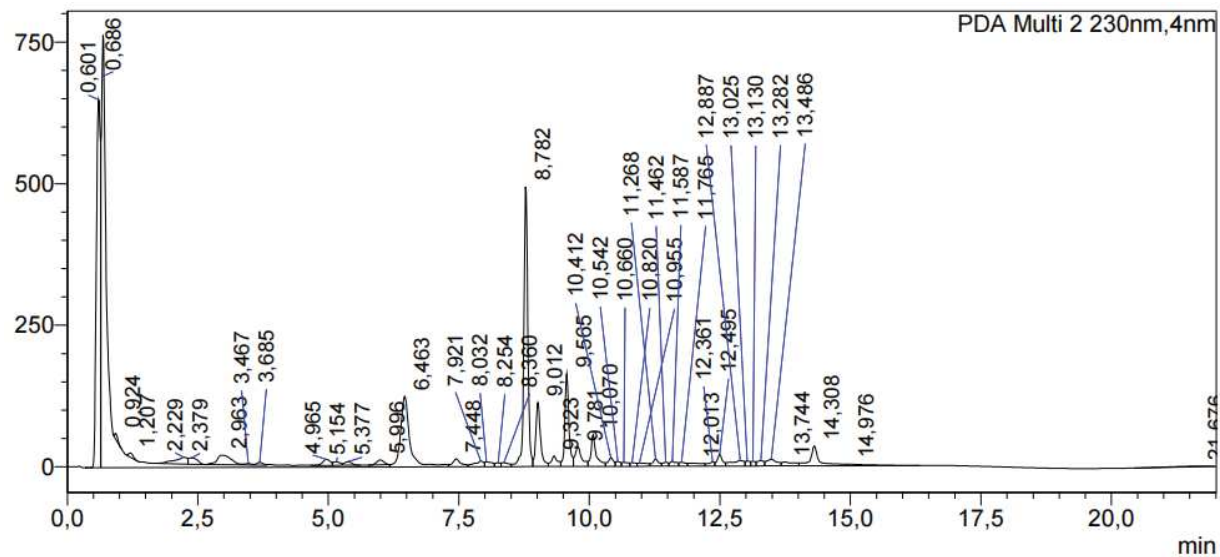


Annexe 10 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de feuilles de Béjaia traitées à 0.7 KGy

Annexes

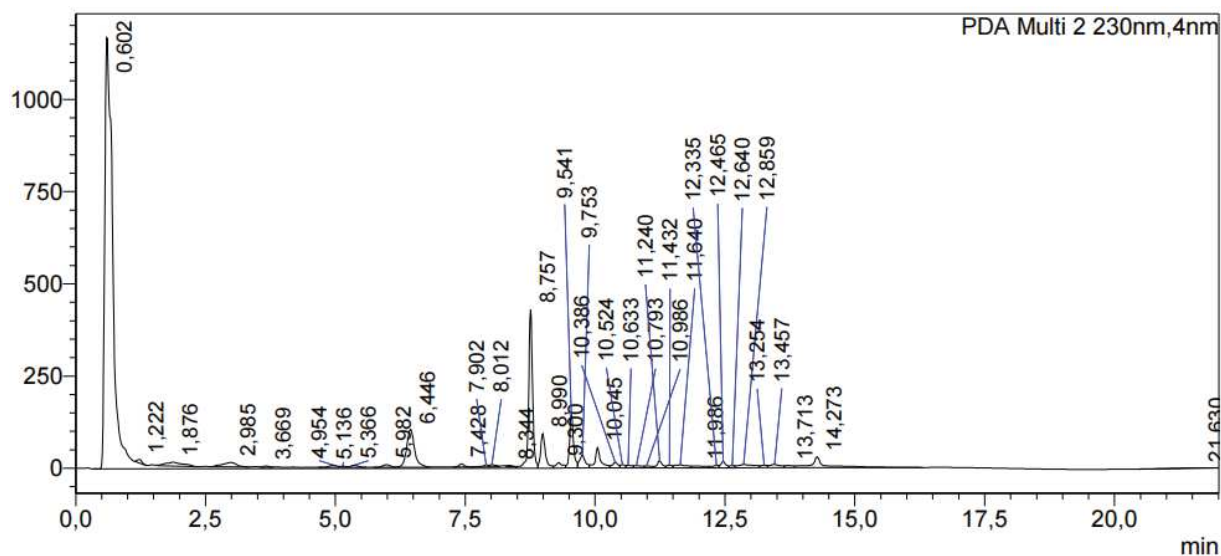


Annexe 11 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de feuilles de Bejaia obtenues par microondes et traitées à 0.7 KGy

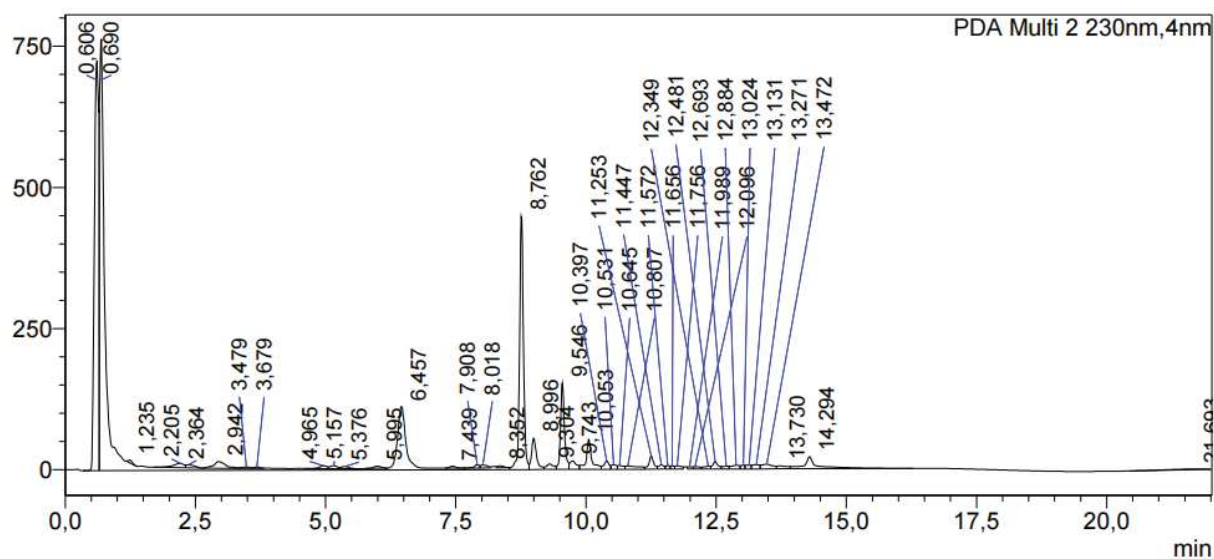


Annexe 12 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de feuilles de Béjaia traitées 0.3KGy

Annexes

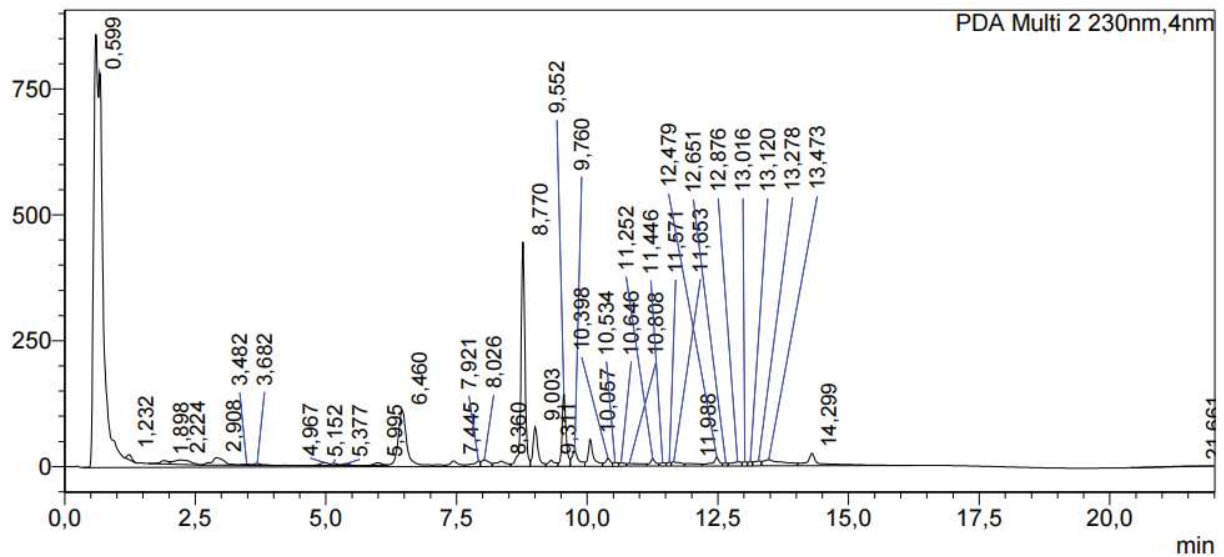


Annexe 13 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de feuilles de Bejaïa obtenues par microondes et traitées à 0.3 KGy

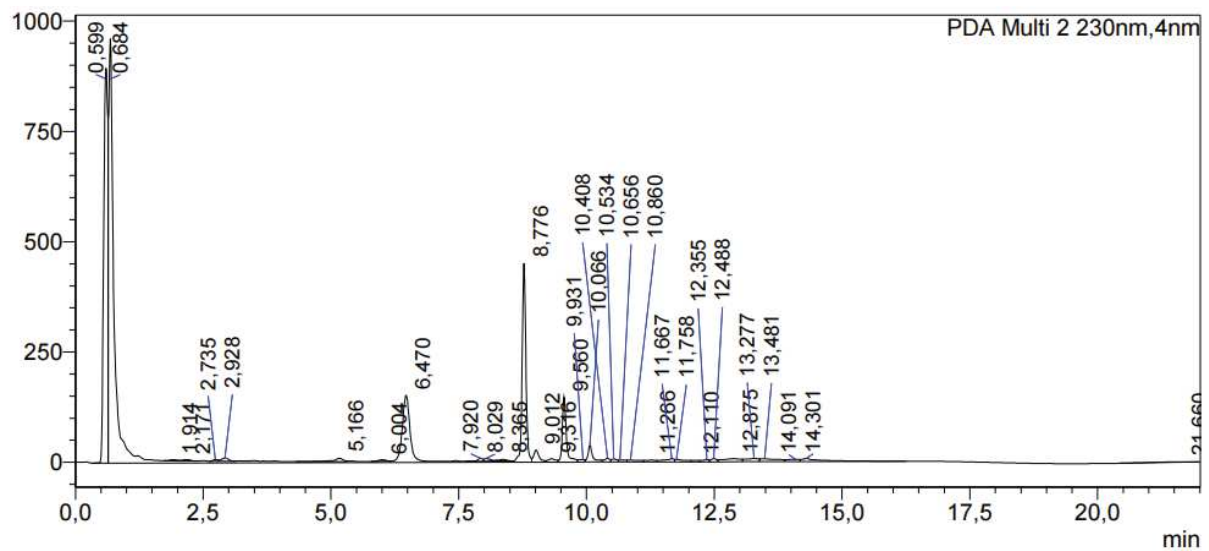


Annexe 14 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de feuilles de Béjaia traitées à 0.1KGy

Annexes

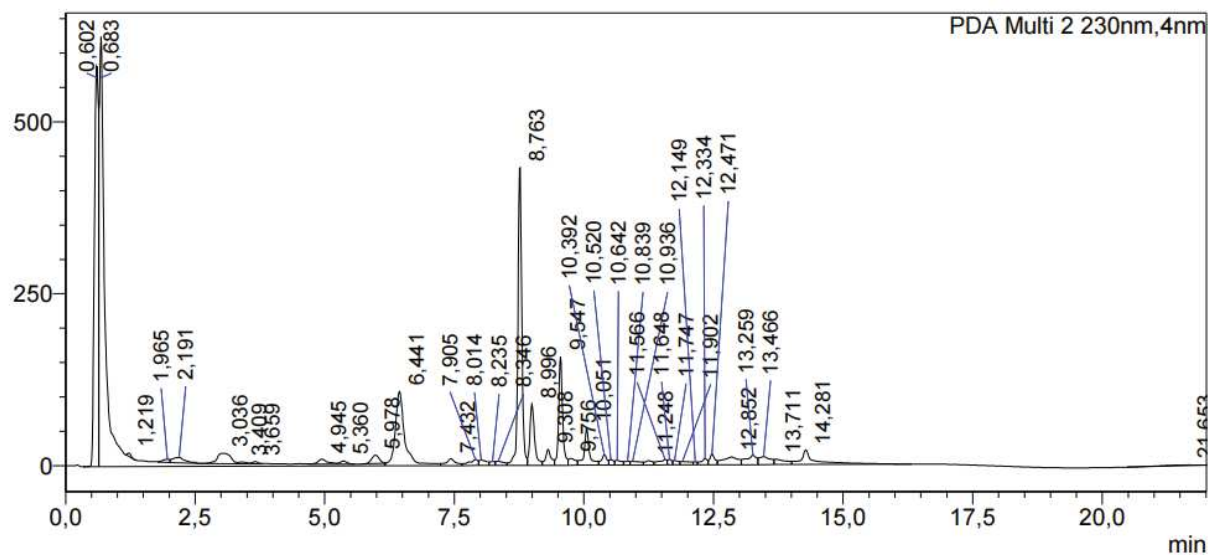


Annexe 15 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de feuilles de Bejaïa obtenues par microondes et traitées à 0.1 KGy

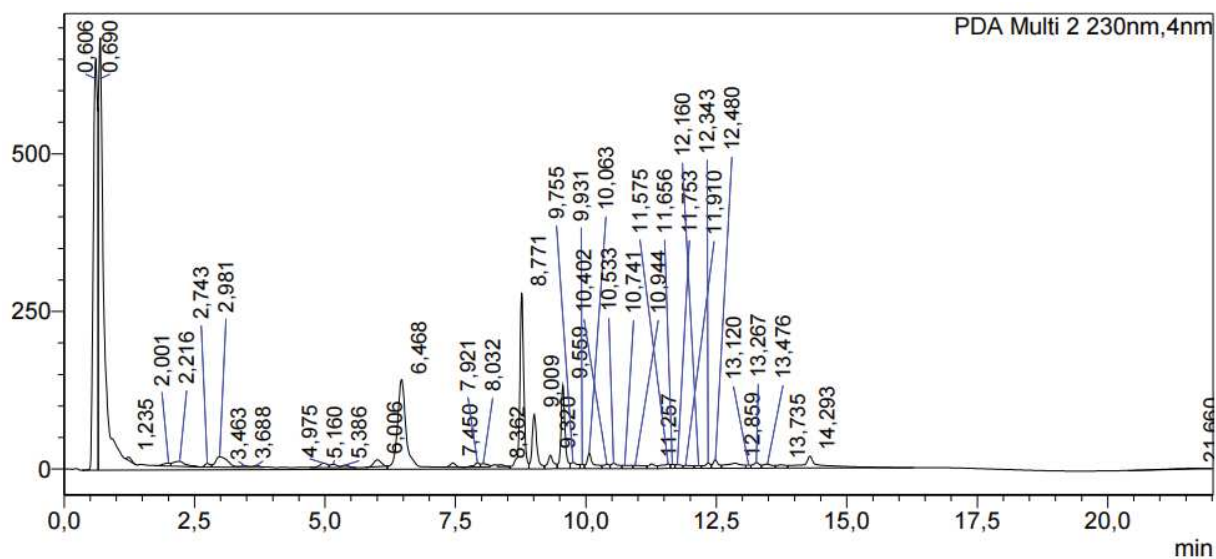


Annexe 16 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de feuilles de Médéa obtenues par micro-ondes et non traitées par rayon gamma

Annexes

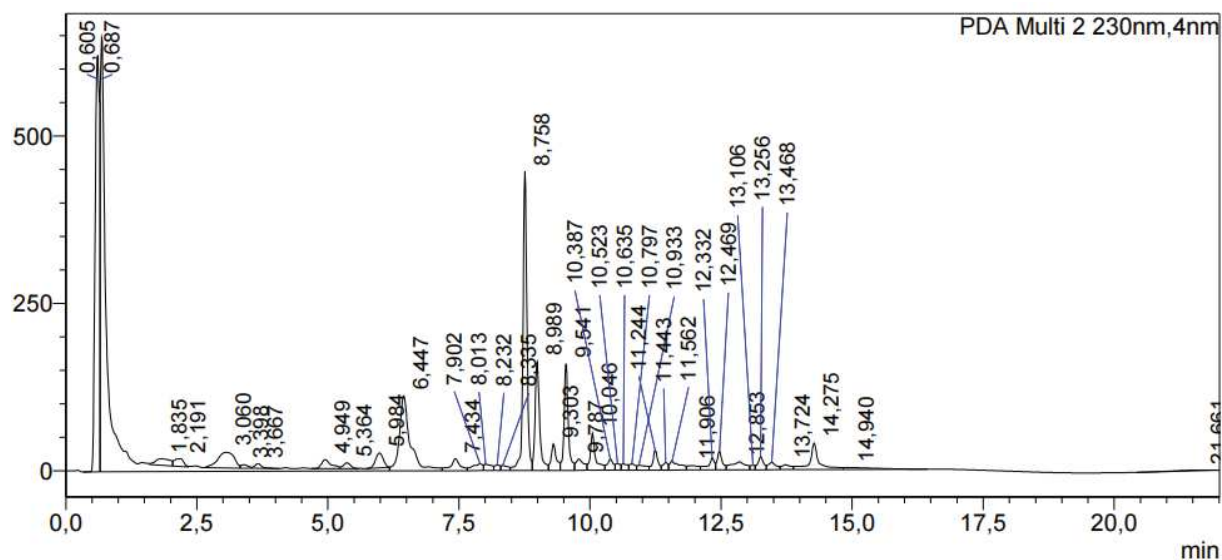


Annexe 17 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de feuilles de Médéa traitées à 10 KGy

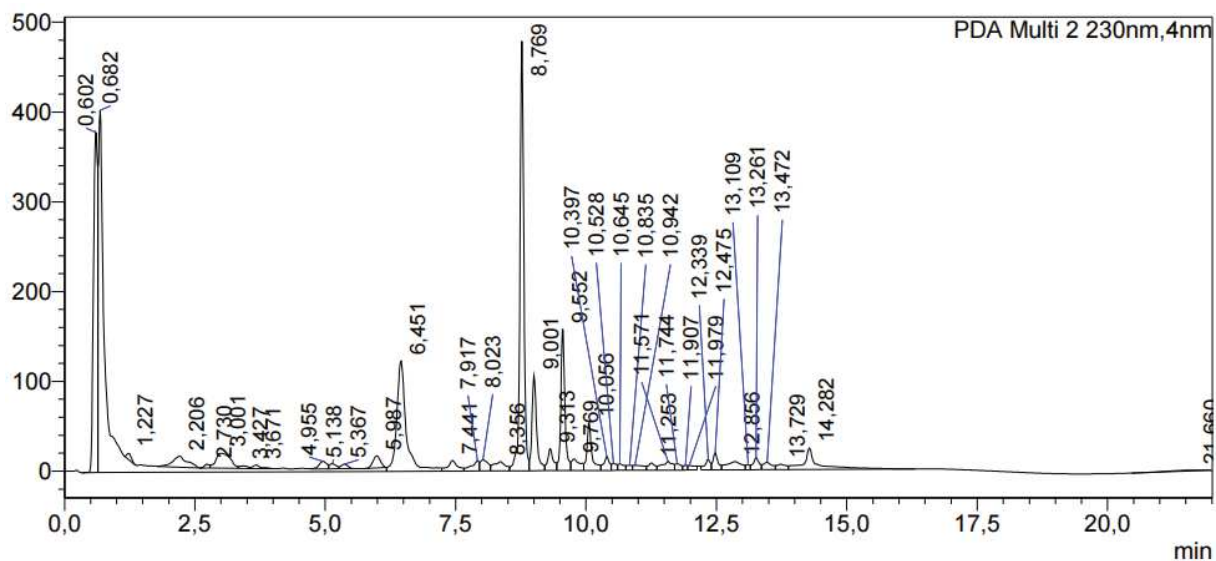


Annexe 18 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de feuilles de Médéa obtenues par microondes et traitées à 10 KGy

Annexes

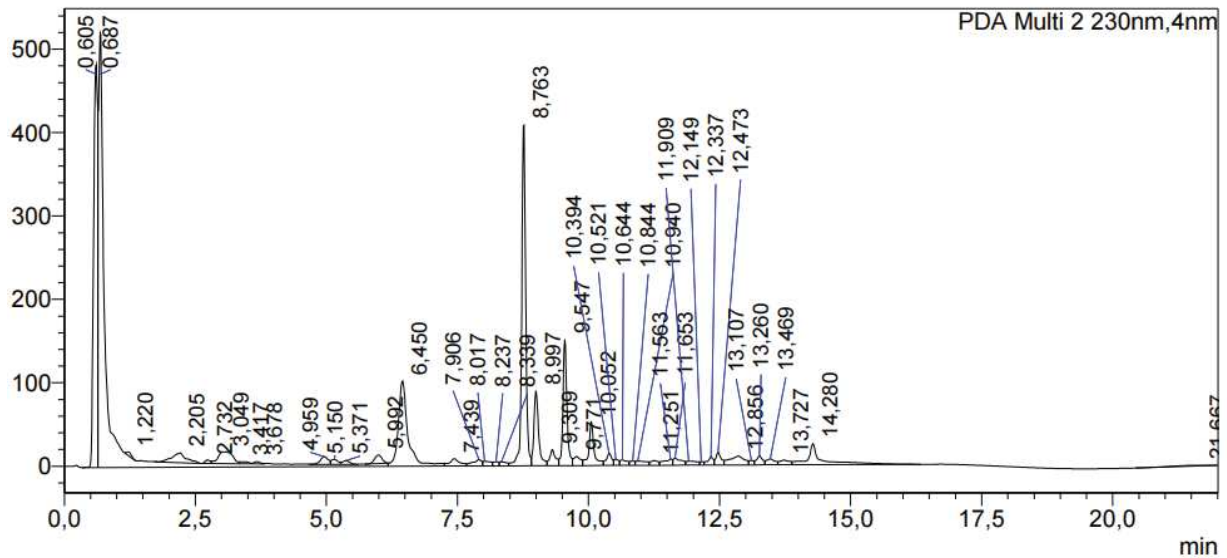


Annexe 19 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de feuilles de Médéa traitées à 7KGy

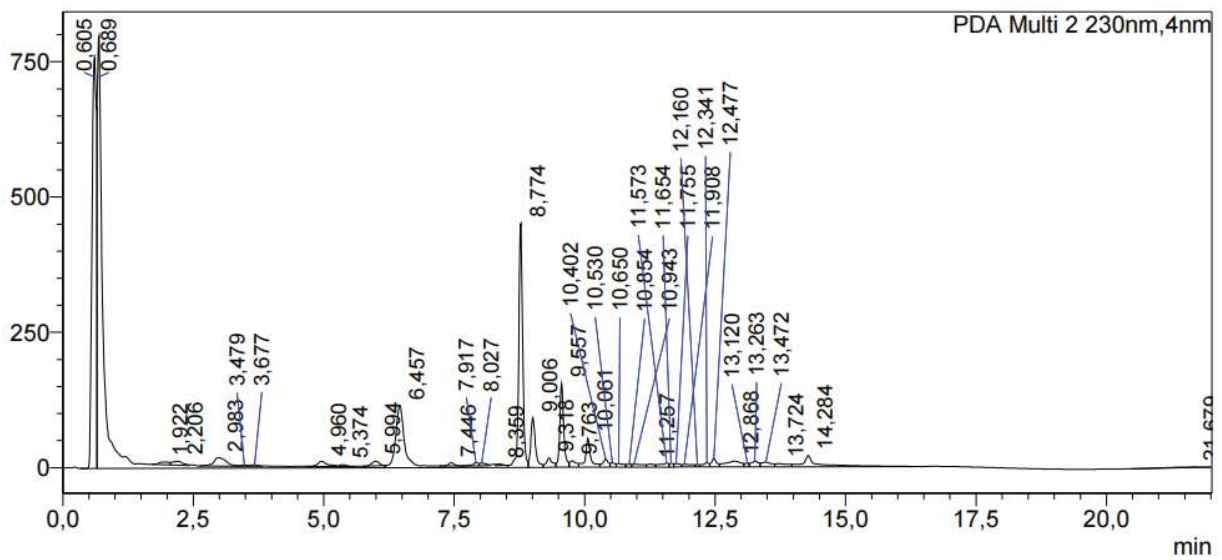


Annexe 20 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de feuilles de Médéa obtenues par microondes et traitées à 7 KGy

Annexes

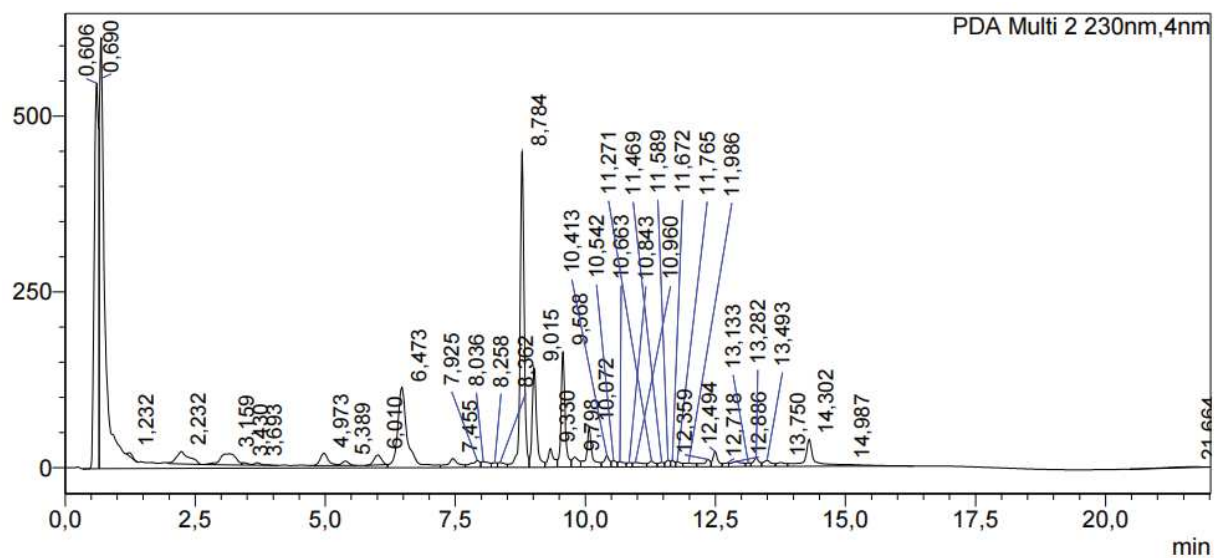


Annexe 21 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de feuilles de Médéa traitées à 3 KGy

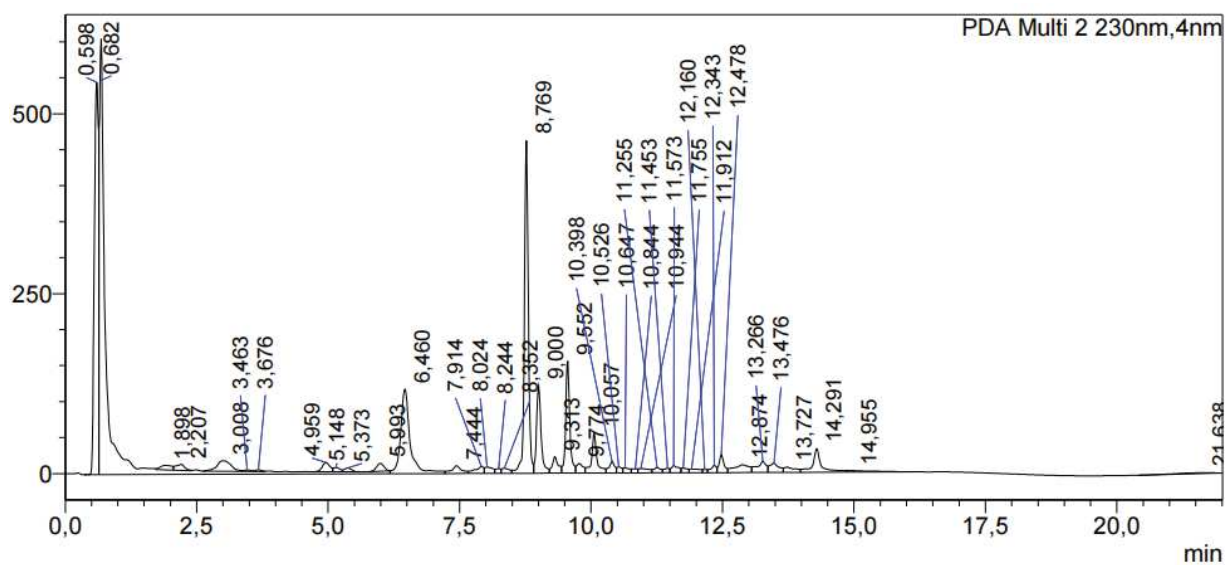


Annexe 22 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de feuilles de Médéa obtenues par microondes et traitées à 3 KGy

Annexes

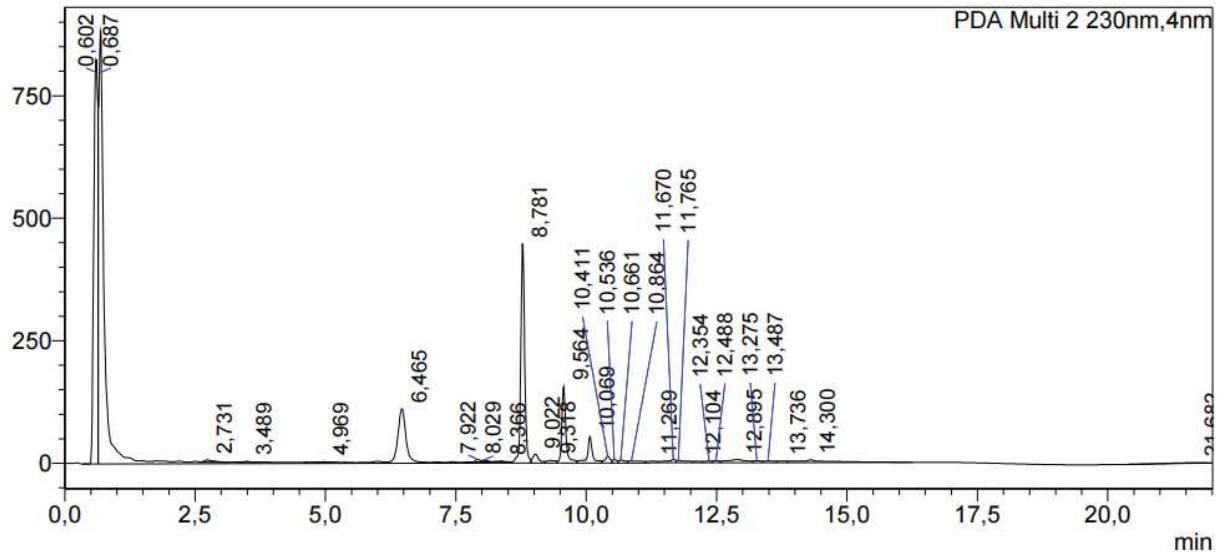


Annexe 23 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de feuilles de Médéa traitées à 1 KGy

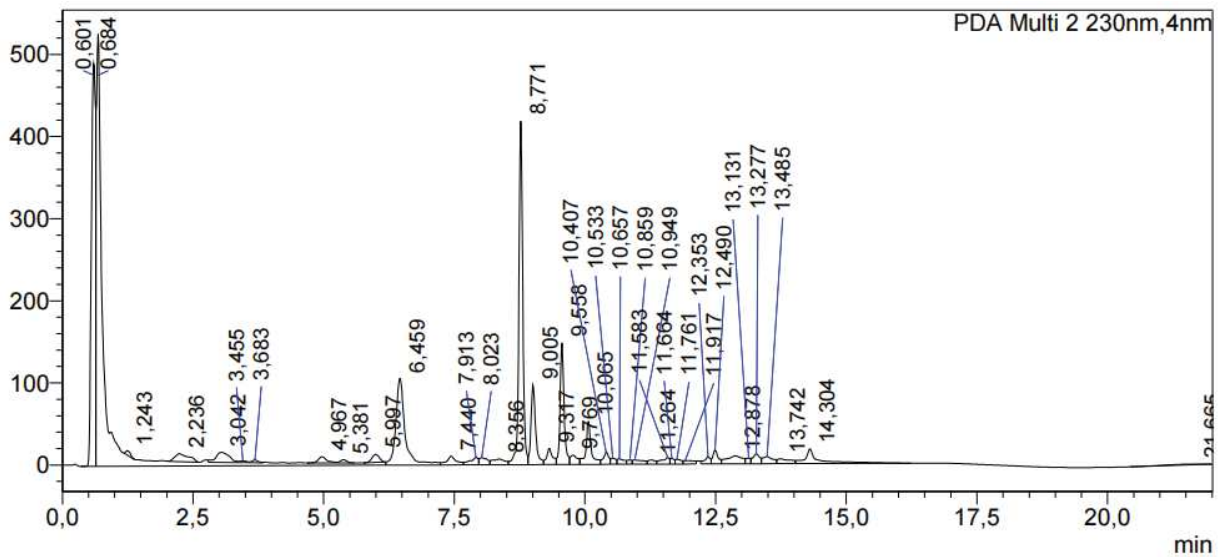


Annexe 24 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de feuilles de Médéa obtenues par microondes et traitées à 1 KGy

Annexes

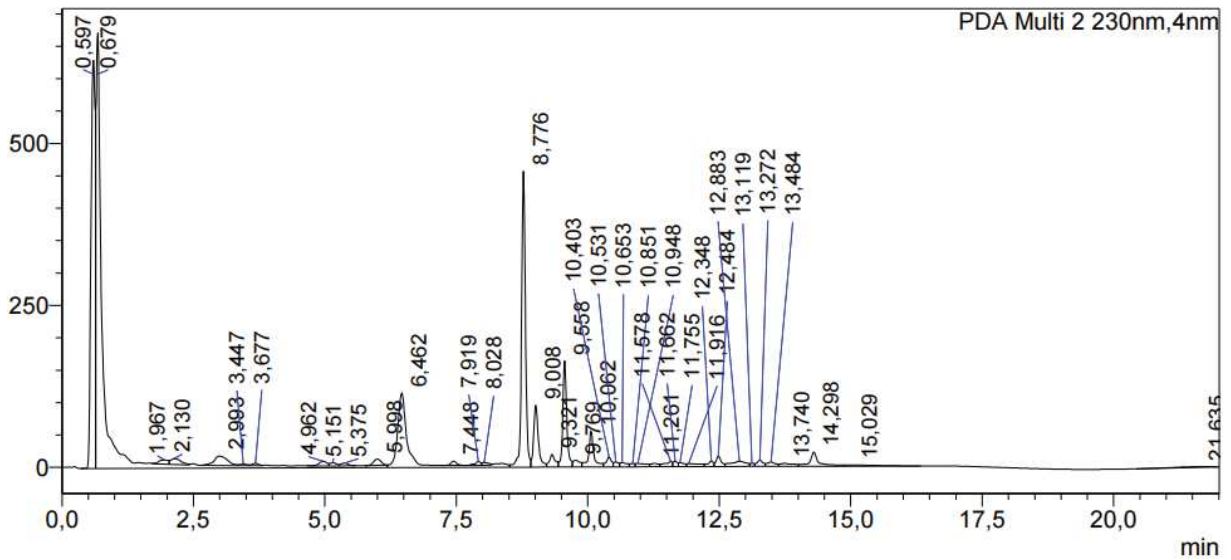


Annexe 25 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de feuilles de Médéa traitées à 0.7 KGy

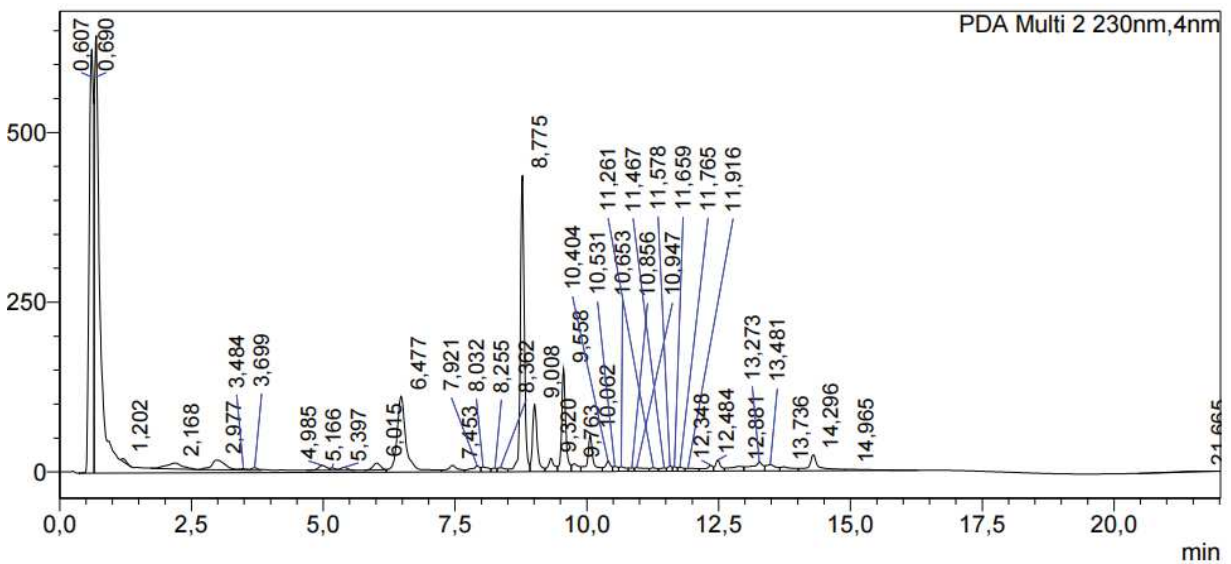


Annexe 26 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de feuilles de Médéa obtenues par microondes et traitées à 0.7 KGy

Annexes

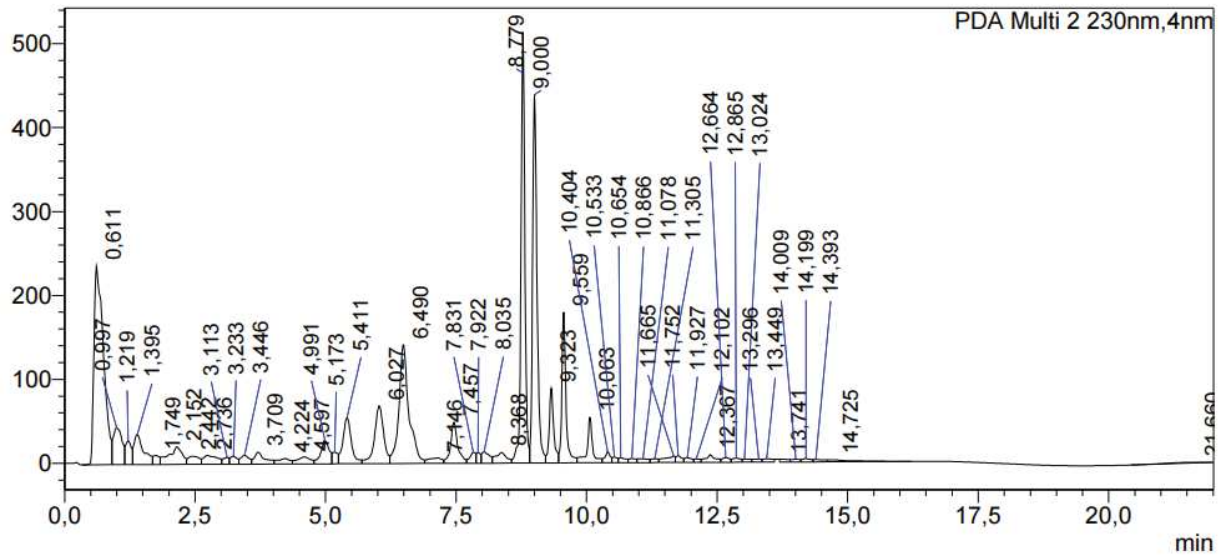


Annexe 27 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de feuilles de Médéa traitées à 0.3 KGy

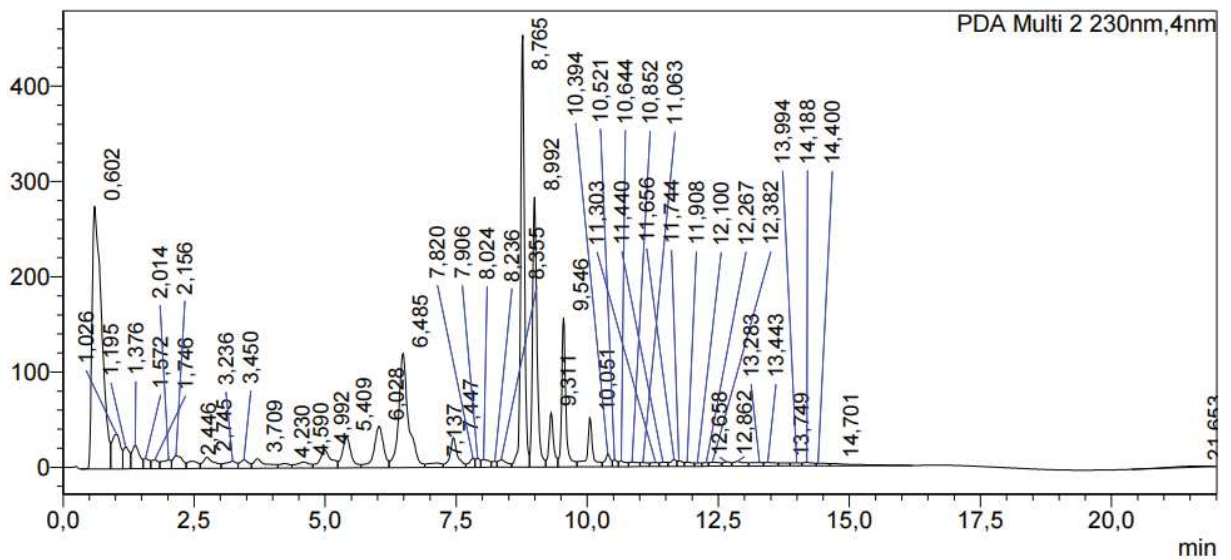


Annexe 28 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de feuilles de Médéa obtenues par microondes et traitées à 0.3 KGy

Annexes

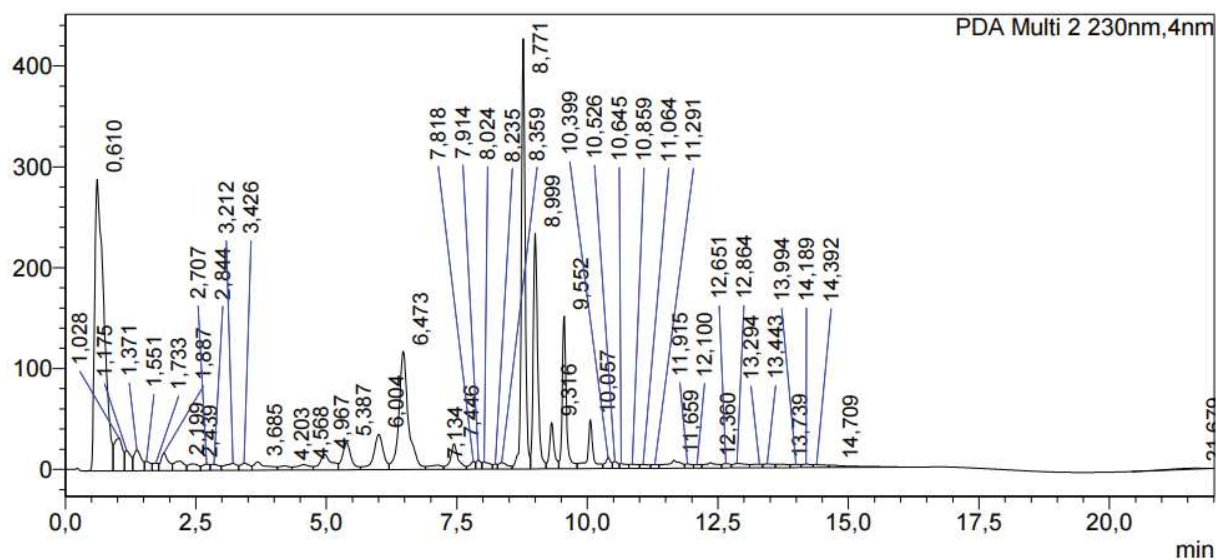


Annexe 29 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de racines de Bejaia non traitées par rayon gamma

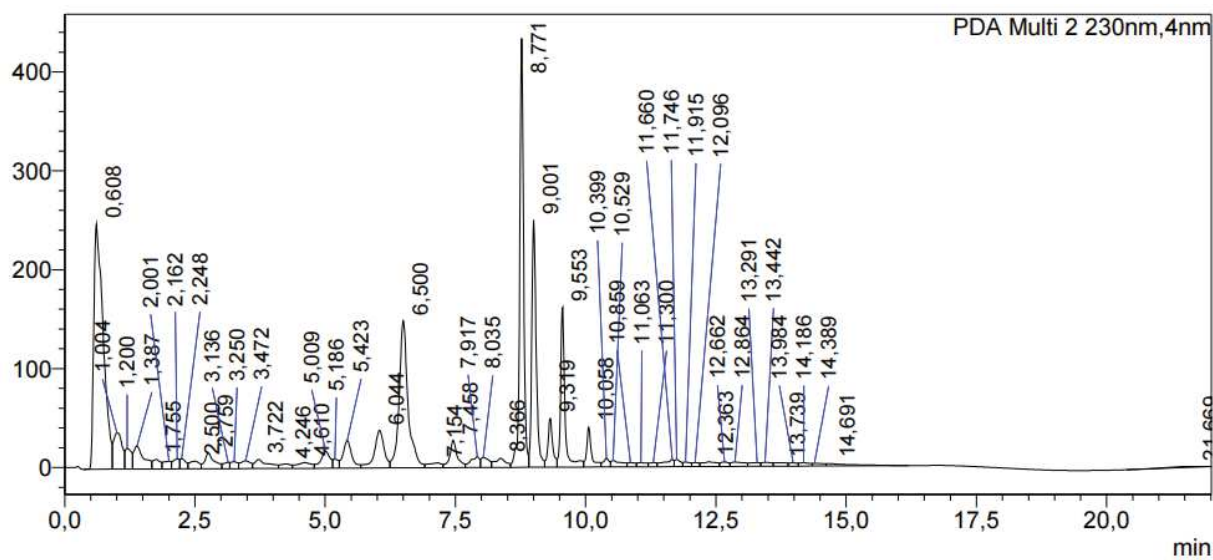


Annexe 30 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de racines de Béjaia traitées à 10 KGy

Annexes

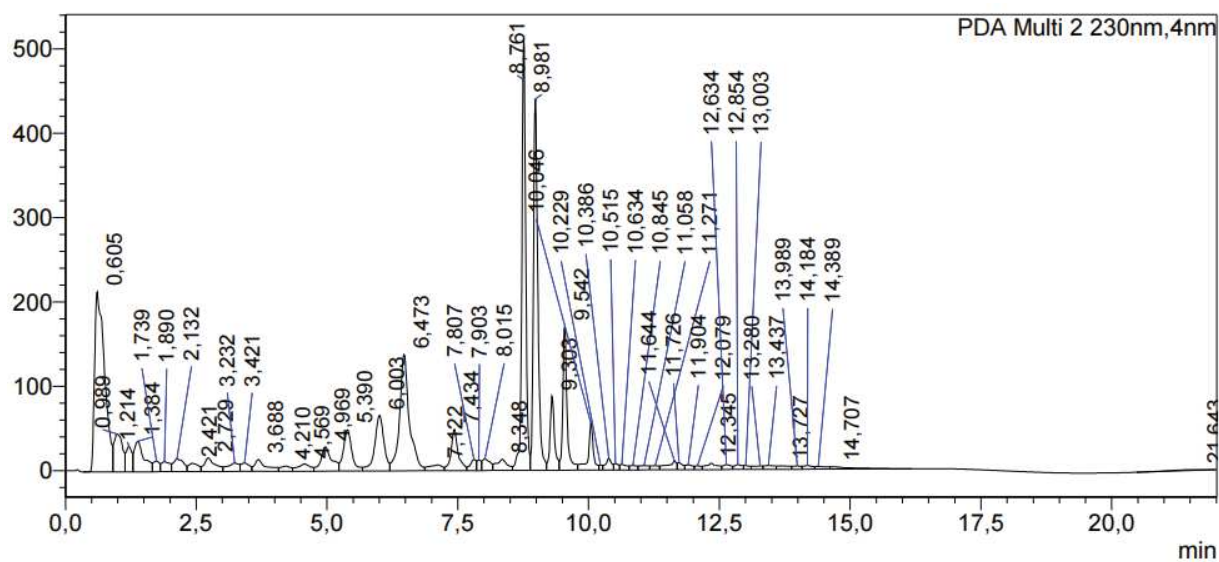


Annexe 31 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de racines de Bejaia obtenues par microondes et traitées à 10 KGy

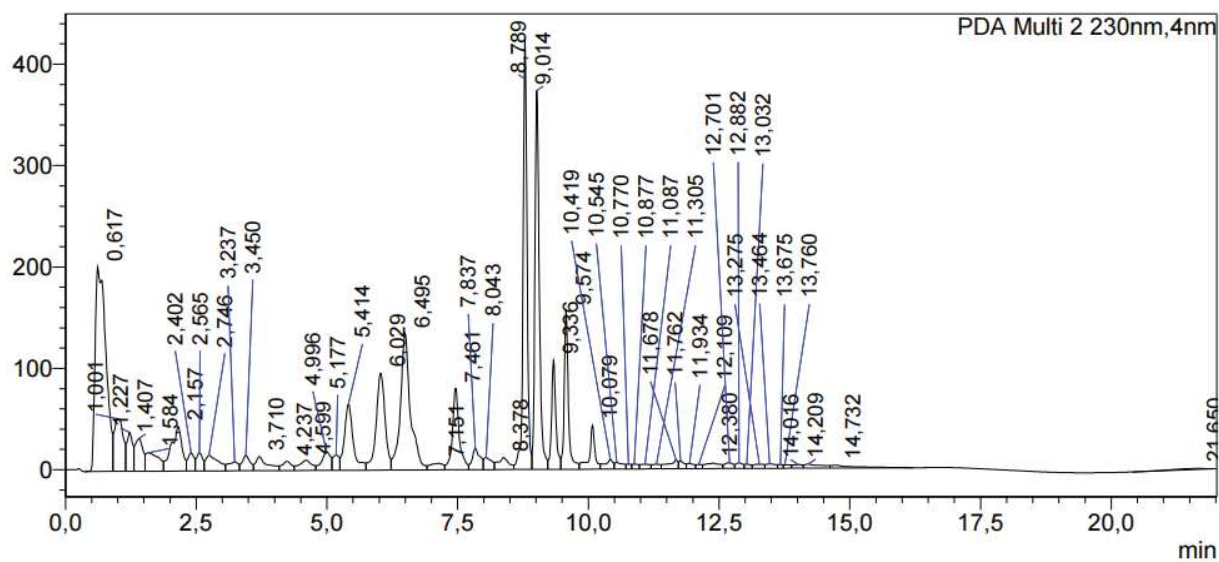


Annexe 32 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de racines de Béjaia traitées à 7 KGy

Annexes

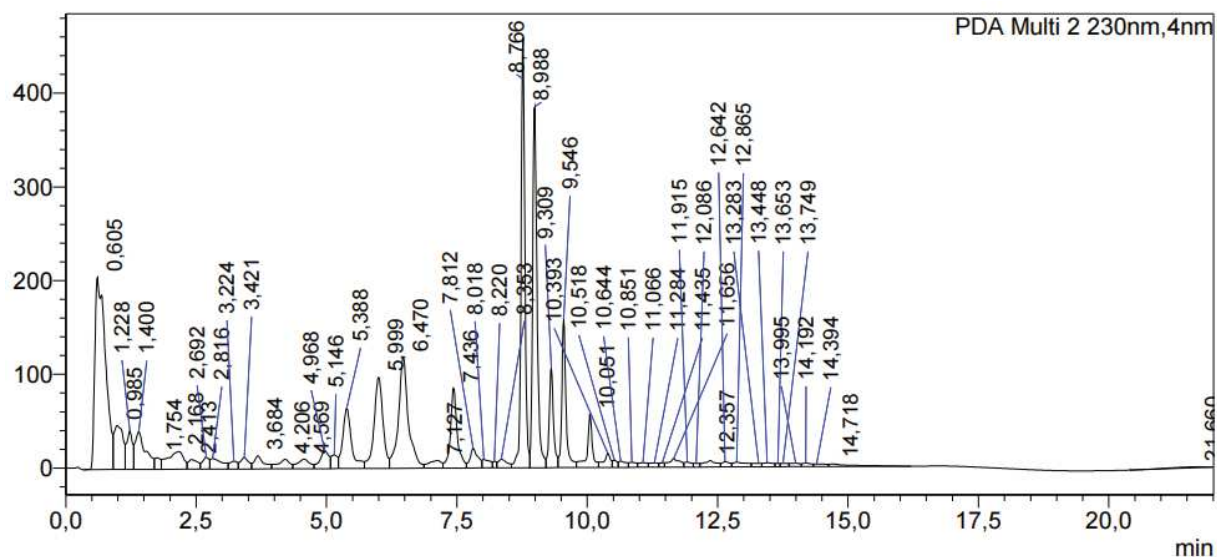


Annexe 33 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de racines de Béjaia obtenues par microondes et traitées à 7 KGy

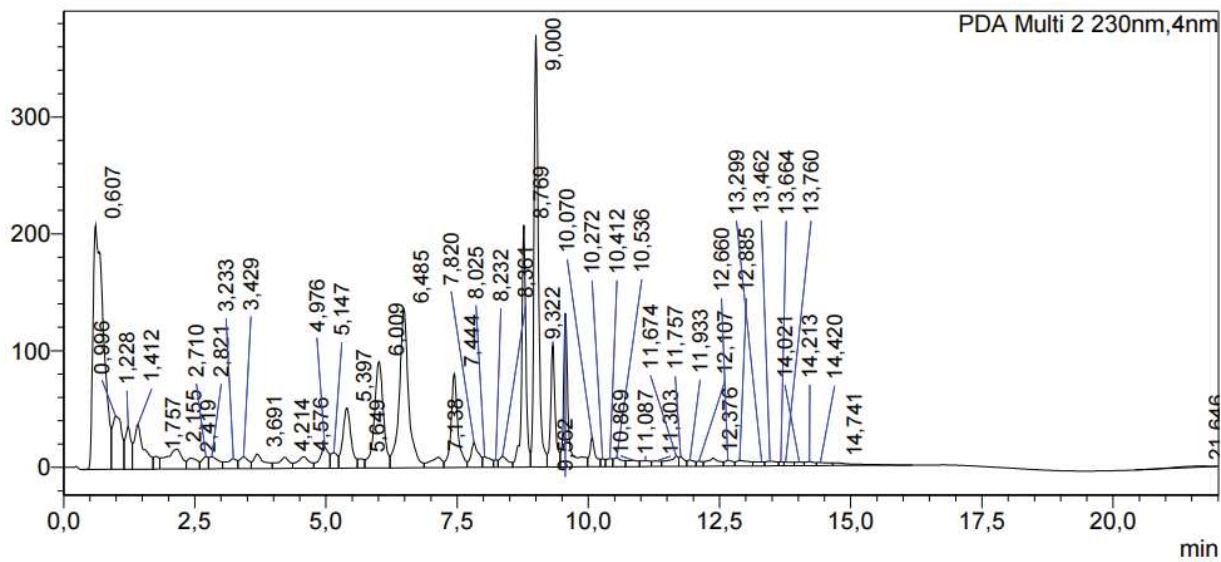


Annexe 34 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de racines de Béjaia traitées à 3 KGy

Annexes

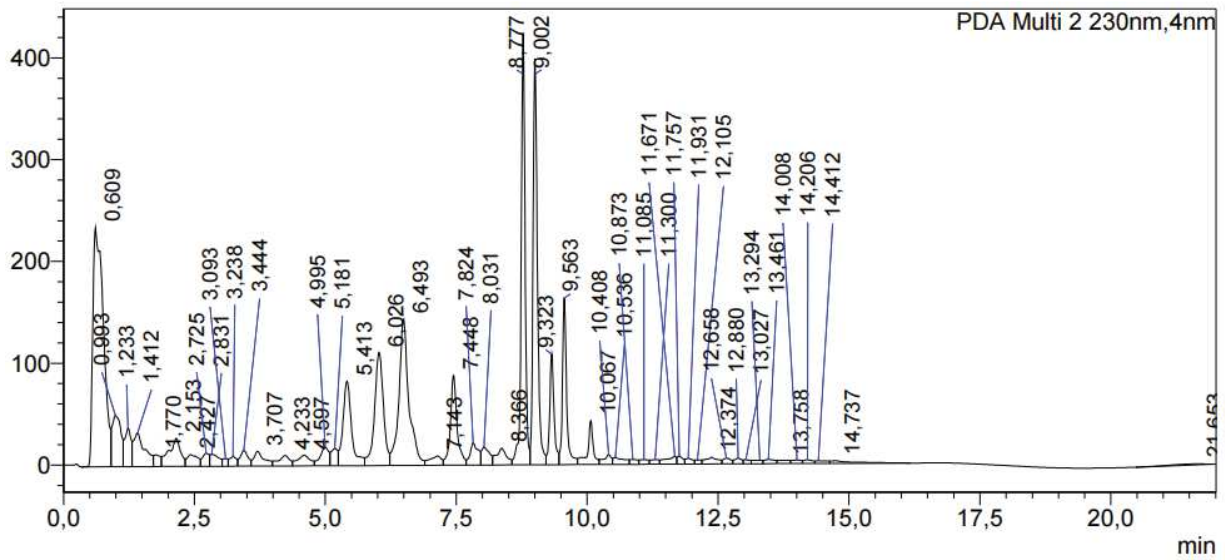


Annexe 35 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de racines de Bejaïa obtenues par microondes et traitées à 3 KGy

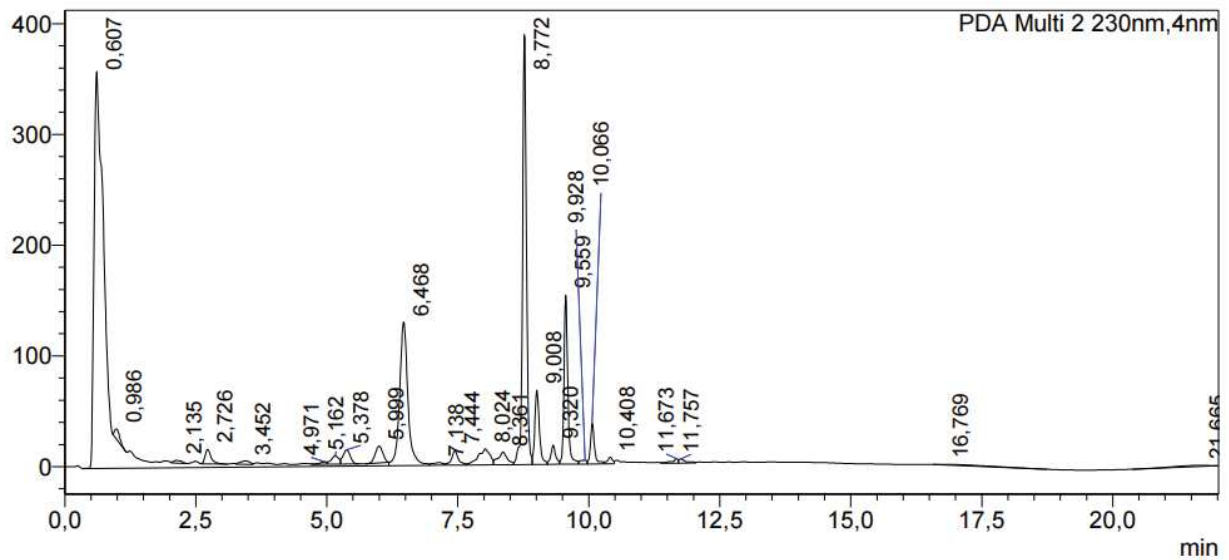


Annexe 36 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de racines de Bejaïa obtenues par microondes et traitées à 1 KGy

Annexes

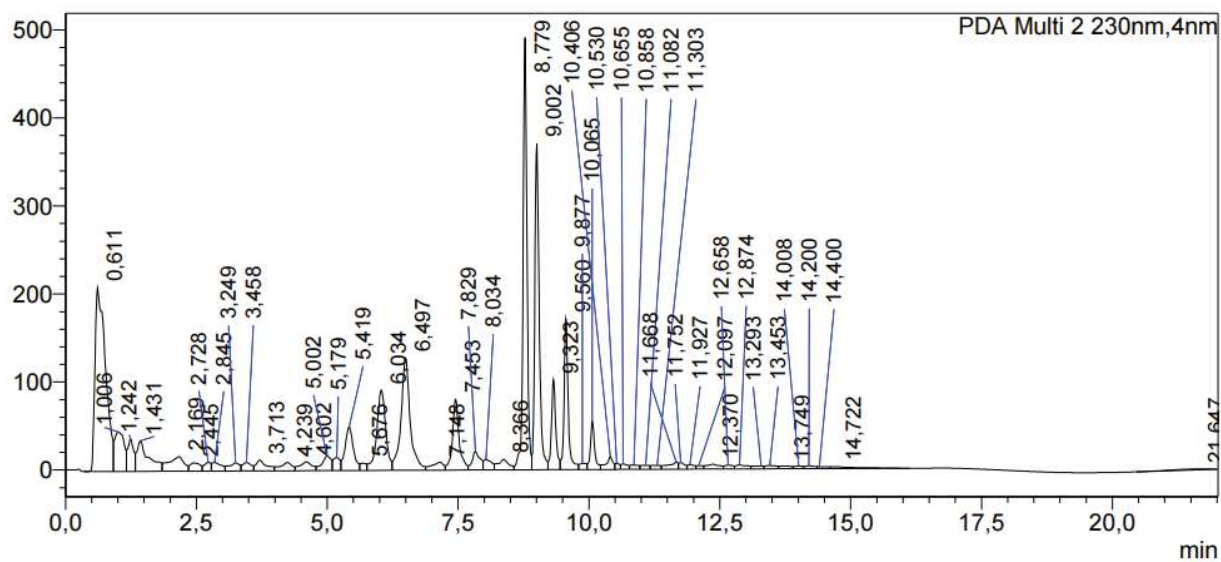


Annexe 37 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de racines de Béjaia traitées à 0.7 KGy

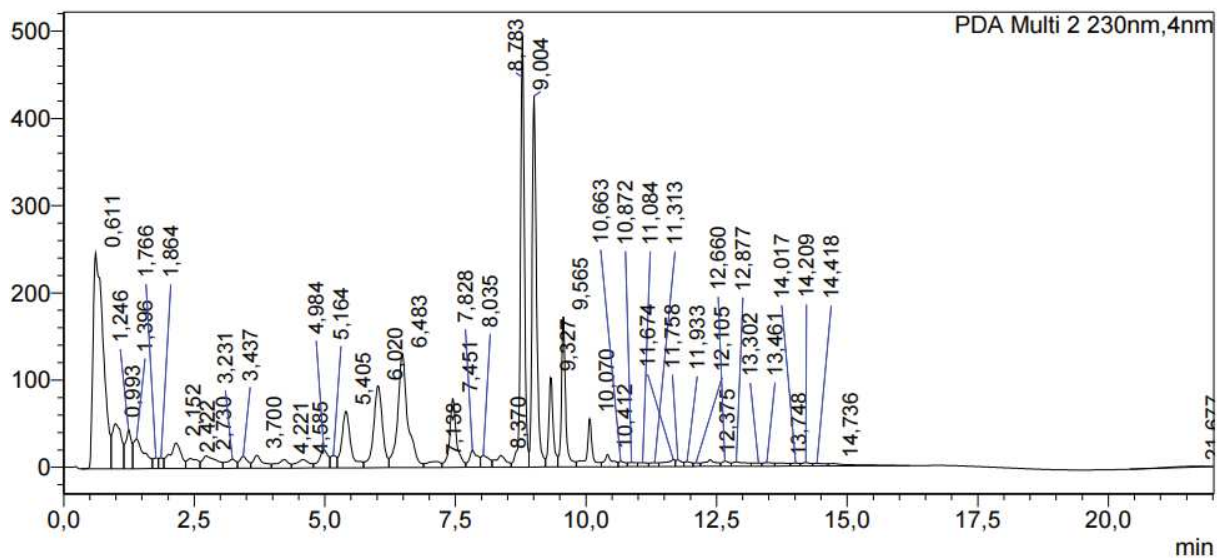


Annexe 38 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de racines de Béjaia obtenues par microondes et traitées à 0.7 KGy

Annexes

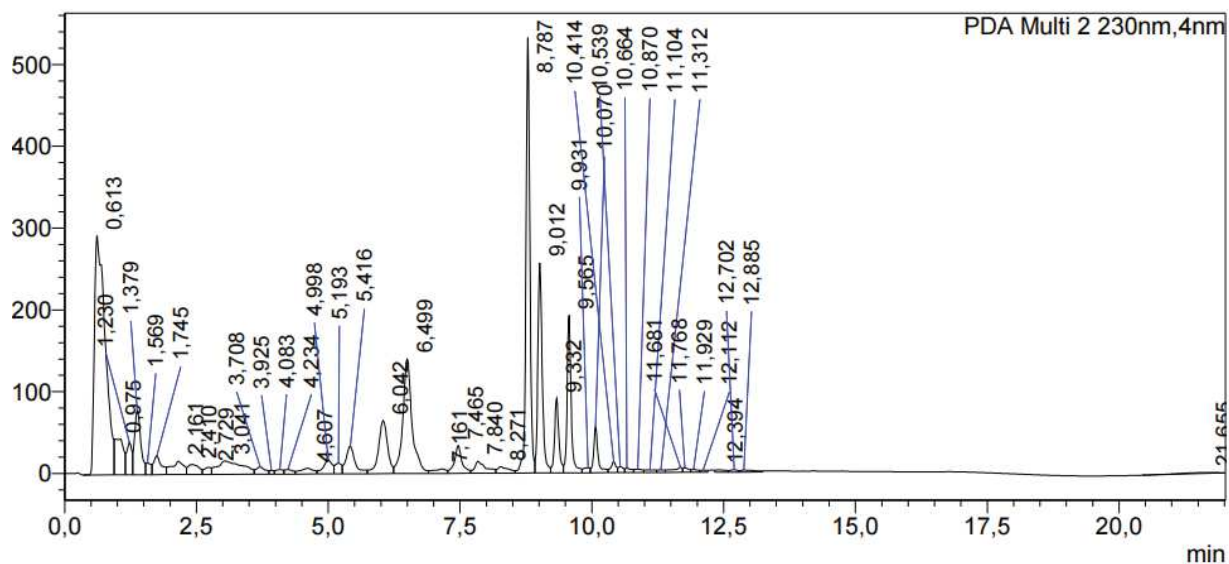


Annexe 39 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de racines de Béjaia traitées à 0.3 KGy

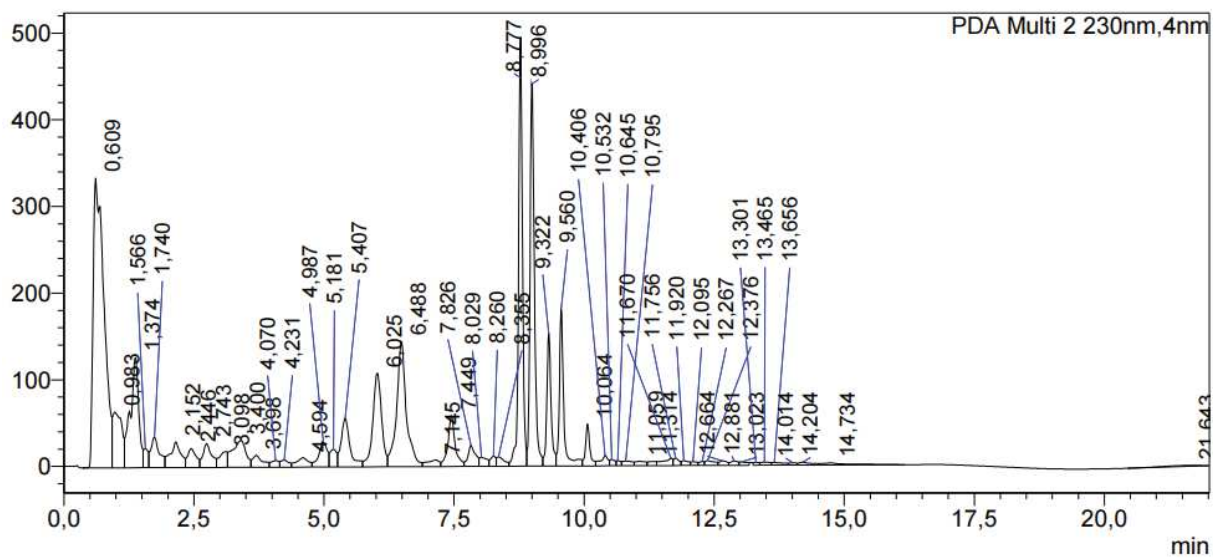


Annexe 40 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de racines de Béjaia traitées à 0.1 KGy

Annexes

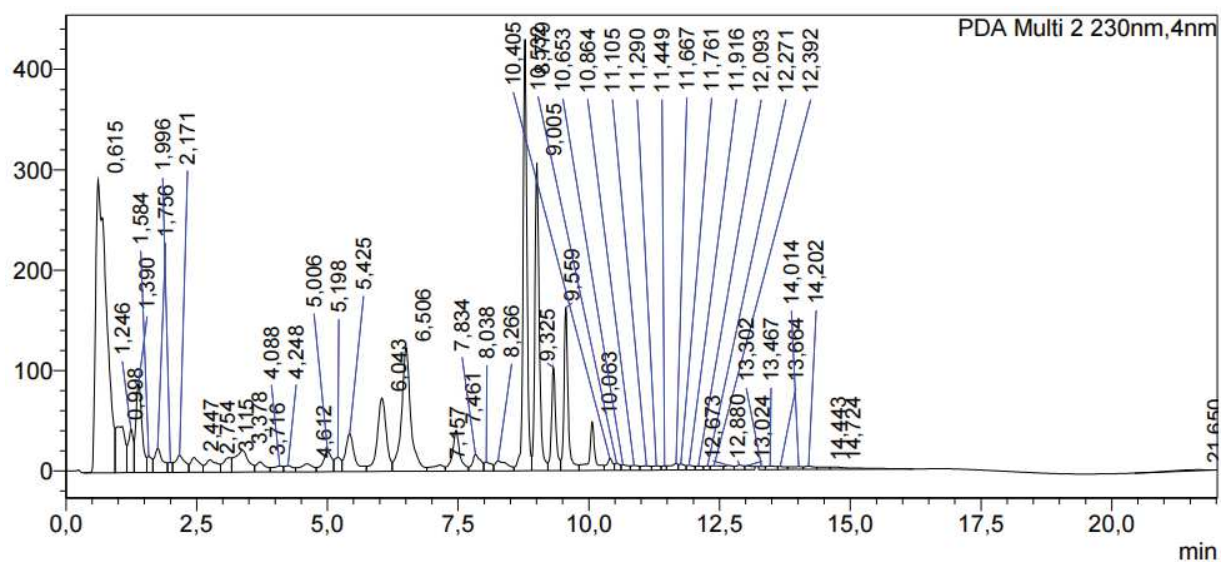


Annexe 41 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de racines de Médéa non traitées par rayon gamma

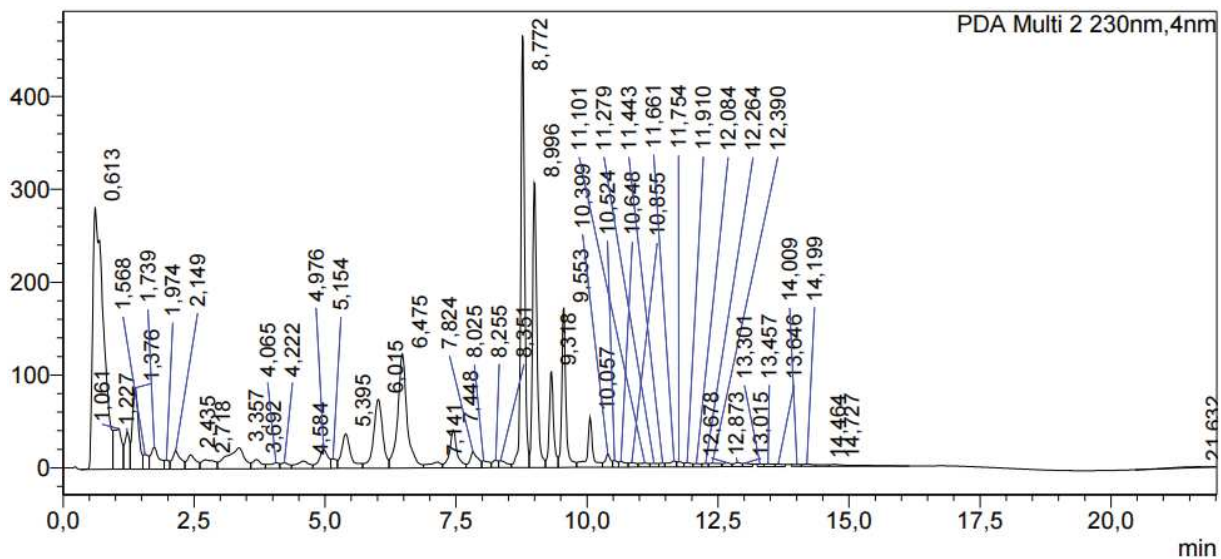


Annexe 42 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de racines de Médéa obtenues par micro-onde et non traitées par rayon gamma

Annexes

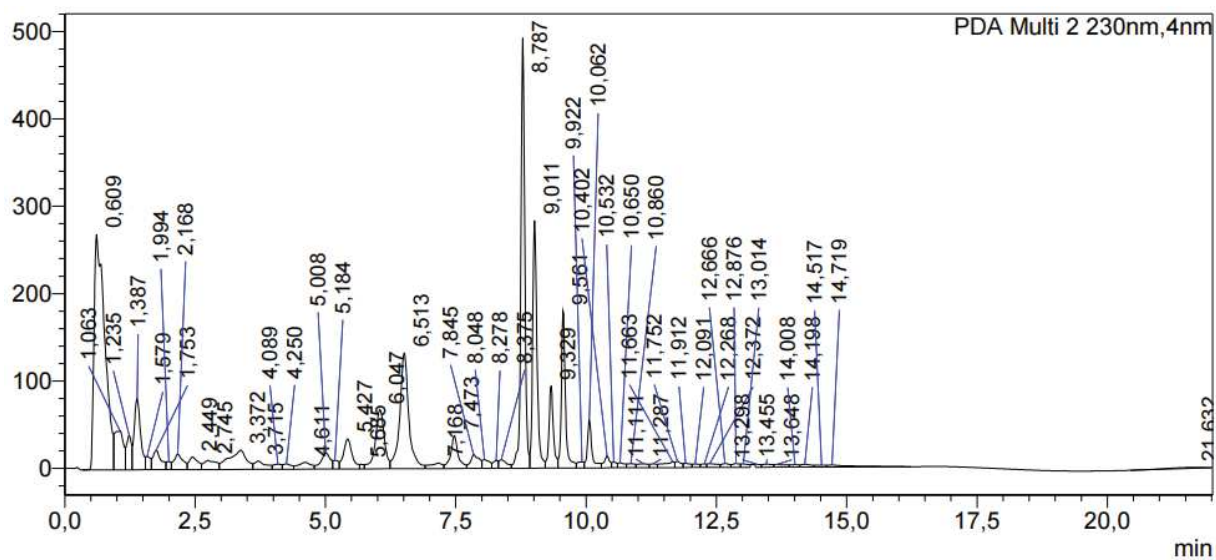


Annexe 43 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de racines de Médéa obtenues par microondes et traitées à 10 KGy

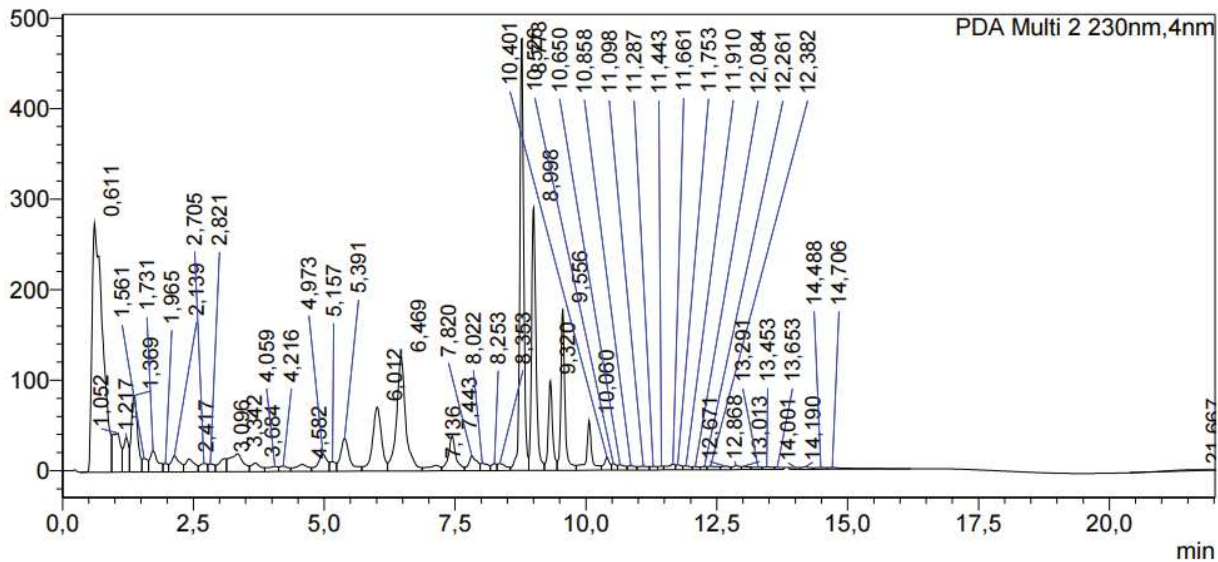


Annexe 44 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de racines de Médéa traitées à 7 KGy

Annexes

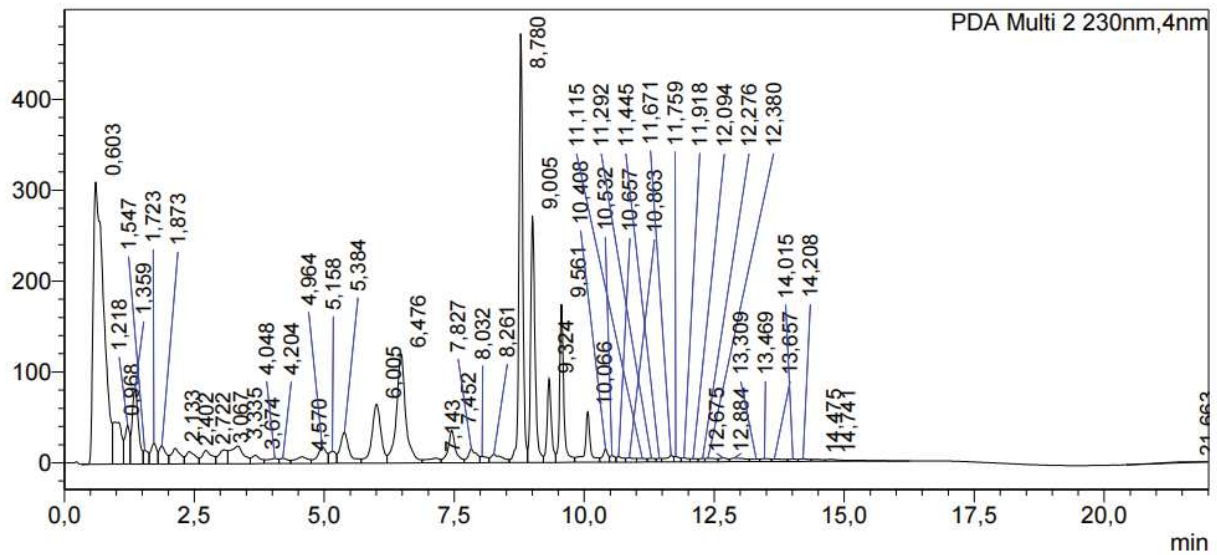


Annexe 45 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de racines de Médéa obtenues par microondes et traitées à 7 KGy

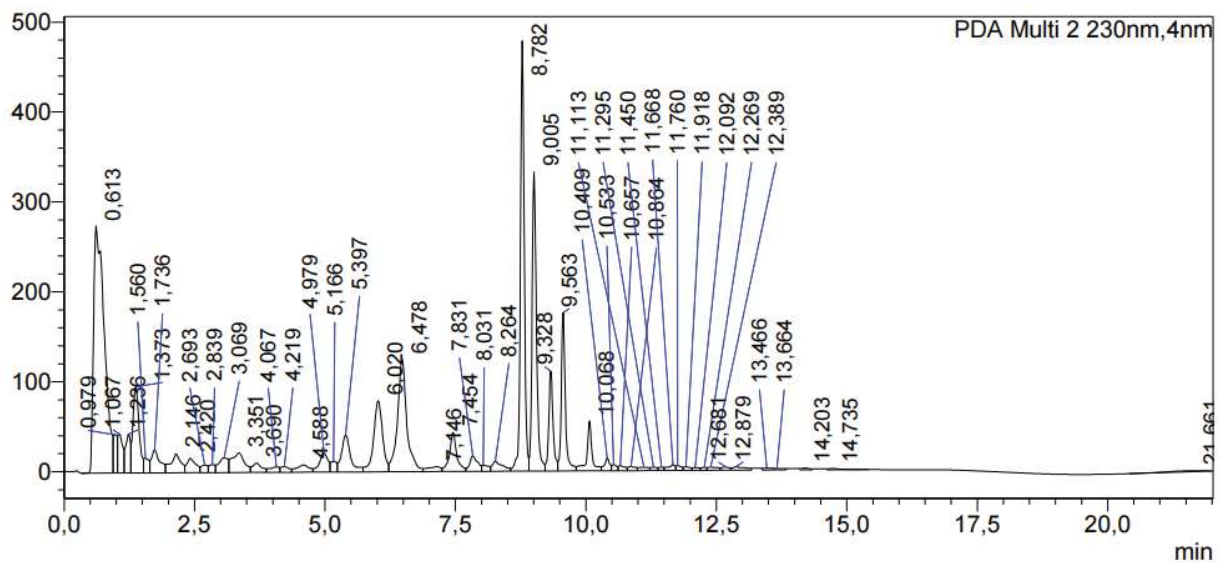


Annexe 46 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de racines de Médéa traitées à 3 KGy

Annexes

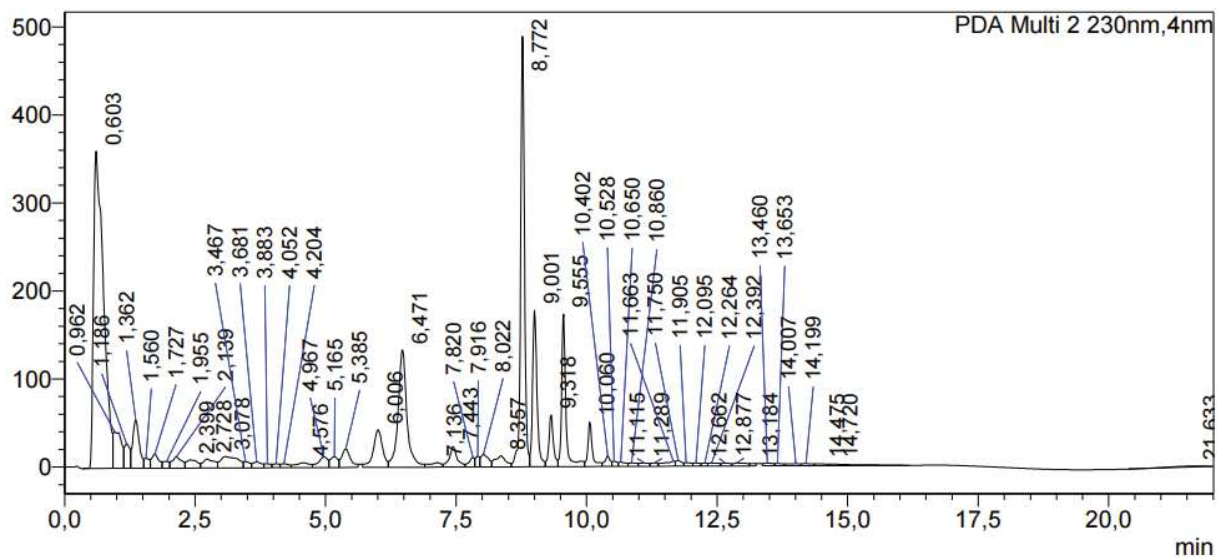


Annexe 47 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de racines de Médéa obtenues par microondes et traitées à 3 KGy

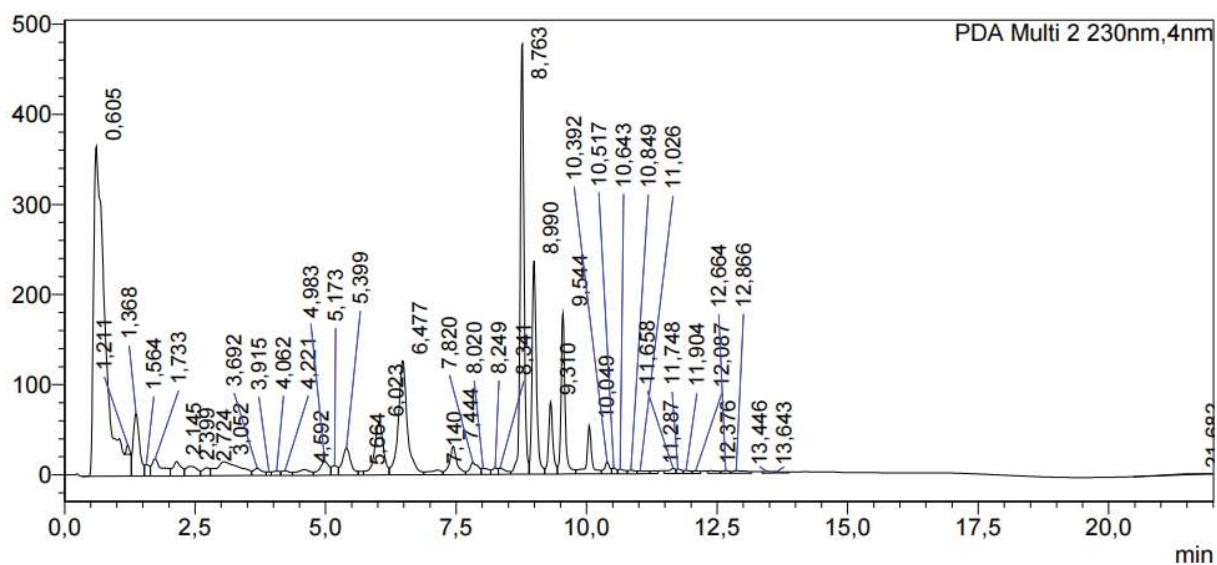


Annexe 48 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de racines de Médéa traitées à 1 KGy

Annexes

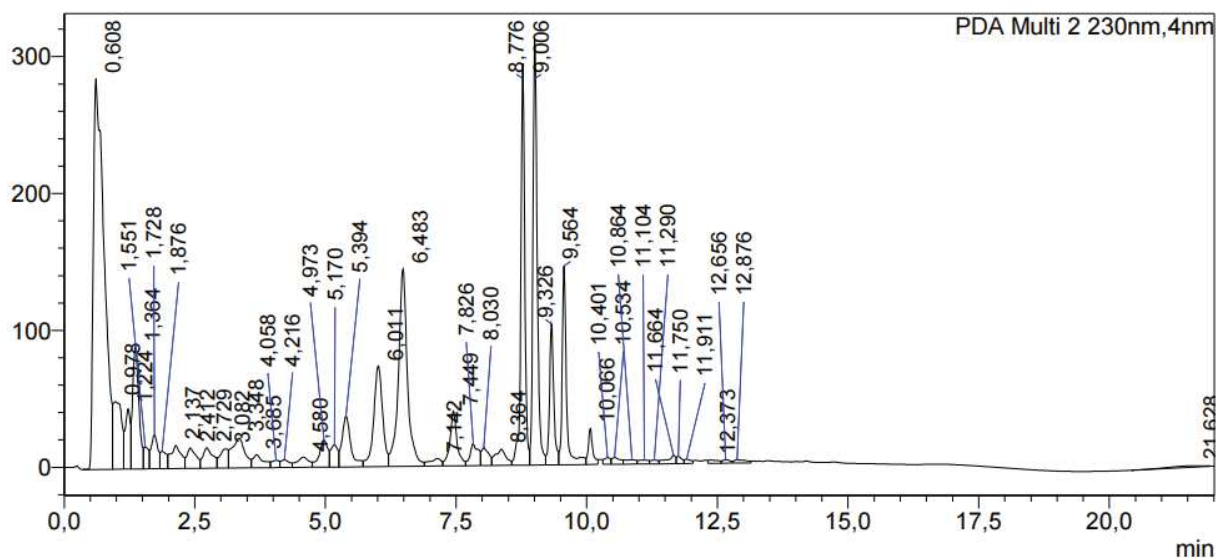


Annexe 49 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de racines de Médéa obtenues par microondes et traitées à 1 KGy

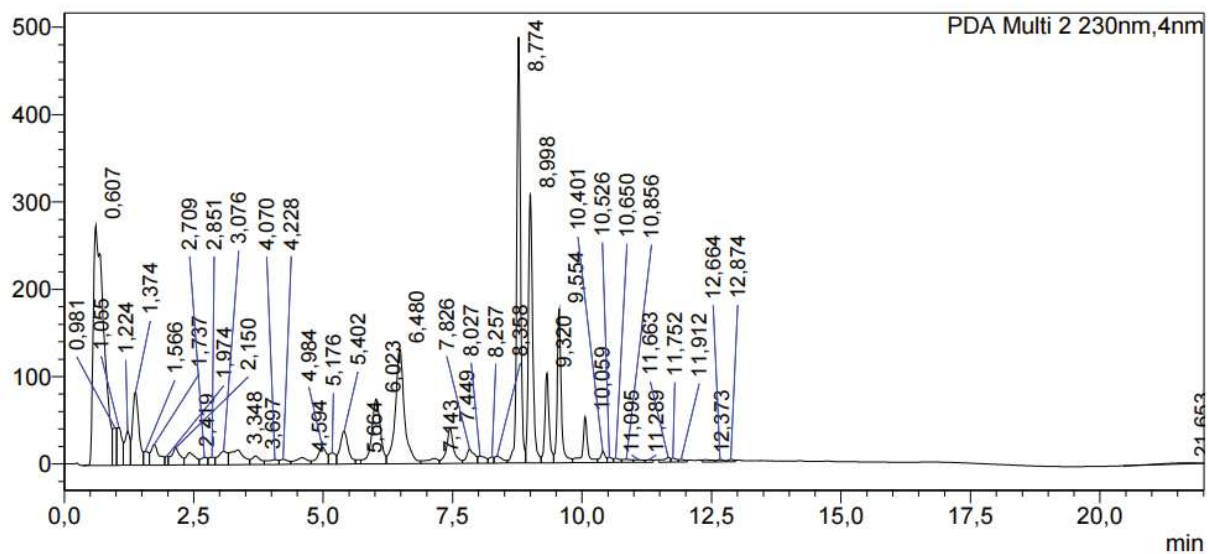


Annexe 50 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de racines de Médéa traitées à 0.7 KGy

Annexes

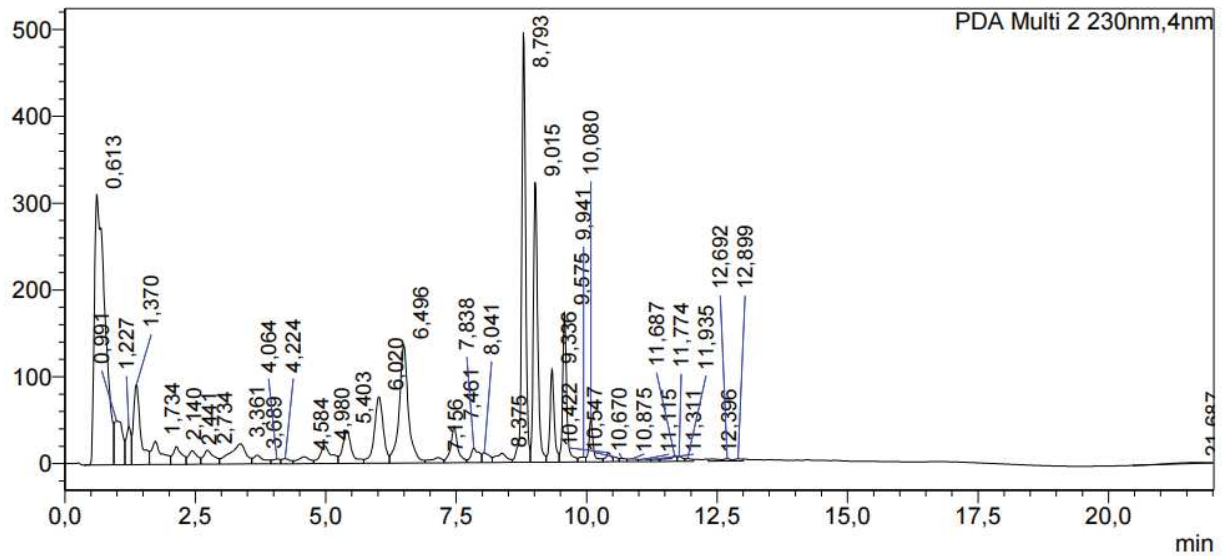


Annexe 50 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de racines de Médéa obtenues par microondes et traitées à 0.7 KGy

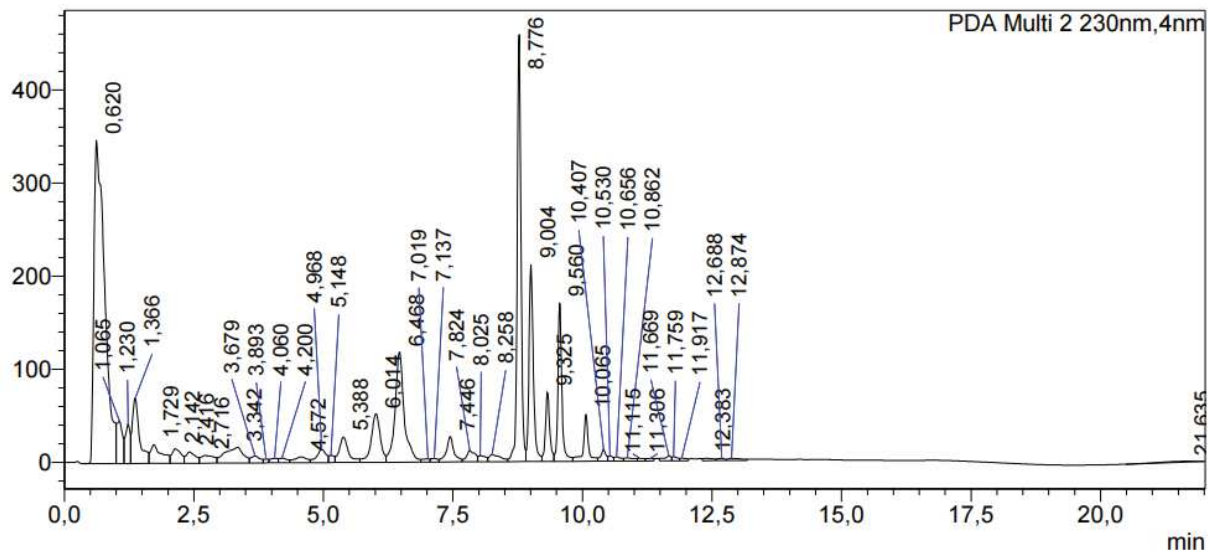


Annexe 51 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de racines de Médéa traitées à 0.3 KGy

Annexes

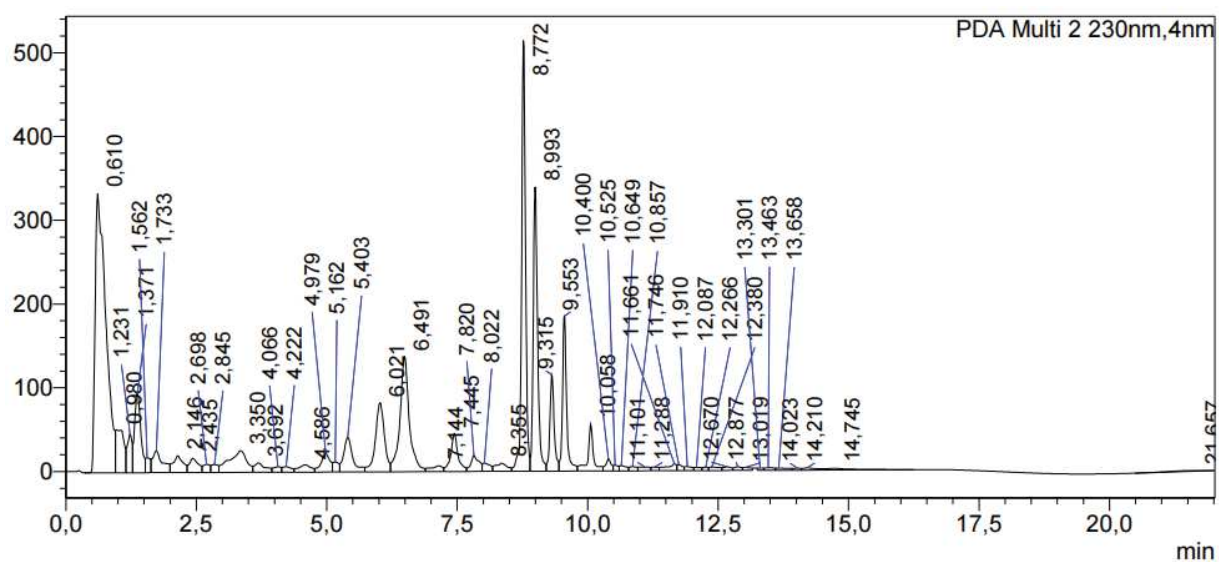


Annexe 52 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de racines de Médéa obtenues par microondes et traitées à 0.3 KGy



Annexe 53 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de racines de Médéa traitées à 0.1 KGy

Annexes



Annexe 54 : Chromatogramme présentant le résultat de l'analyse HPLC de l'extrait de racines de Médéa obtenues par microondes et traitées à 0.1 KGy

Publications

et

Communications

Communications

- **Communication affichée**

Atelier Régional sur « La valorisation des Plantes aromatiques et médicinales dans les pays du Maghreb », 08-10 Décembre 2015, INRF, Alger

« Analyse des graines de *Thapsia garganica* L. Plante médicinale de l'Algérie par
Headspace Solid-Phase Micro-Extraction accouplé par GC-MS »

Co-auteur : BENKACI-ALI Farid

- **Communication orale**

Journée Mondiale de l'étudiant, ENSA, Alger

« Effet des différentes radiations électromagnétiques sur l'aspect qualitatif et quantitatif des substances chimiques isolées à partir de plantes médicinales »

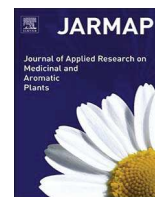
Publications

Abir M. Mohamed Ibrahima, Karen A. Martinez-Swatson, Farid Benkaci-Ali, Federico Cozzi, Ferhat Zoulikha, Henrik T. Simonsen. (2018). Effects of gamma irradiation and comparison of different extraction methods on sesquiterpene lactone yields from the medicinal plant *Thapsia garganica* L.(Apiaceae). Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants. 8 : 26–32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jarmap.2017.09.002>



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jarmap

Effects of gamma irradiation and comparison of different extraction methods on sesquiterpene lactone yields from the medicinal plant *Thapsia garganica* L. (Apiaceae)



Abir M. Mohamed Ibrahim^{a,1}, Karen A. Martinez-Swatson^{b,e,1}, Farid Benkaci-Ali^c, Federico Cozzi^d, Ferhat Zoulikha^a, Henrik T. Simonsen^{e,*}

^a Department of Food Technology, Laboratory of Food Technology and Humane nutrition, National School Agronomic (ENSA) Avenue Hassan Badi, 16000, El - Harrach, Algiers, Algeria

^b National History Museum of Denmark, University of Copenhagen, Øster Voldgade 5-7, 1350 Copenhagen, Denmark

^c Laboratory of Organic and Functional Analysis, Faculty of Chemistry, University of Sciences and Technologies Houari Boumediène, USTHB, BP 32 El Alia, Bâb-Ezzouar, Algiers, Algeria

^d Department of Plant Biology and Environmental Sciences, University of Copenhagen, Thorvaldsensvej 40, 1871 Frederiksberg, Denmark

^e Department of Biotechnology and Biomedicine, Technical University of Denmark, Søtofts Plads, 2800 Kgs. Lyngby, Denmark

ARTICLE INFO

Keywords:

Thapsia garganica
Gamma irradiation
Microwave assisted extraction
Thapsigargin
Antioxidant

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Thapsia garganica* L. roots are used in Algerian traditional medicine for a number of ailments. It is used in a poultice as an antitussive treatment of acute bronchitis and pneumonia, in preparations with milk or oil taken orally to treat common lung diseases, and with the direct application of root sections for the soothing of dental pains.

Aim of the study: The objective of this study was to evaluate the combined effect of microwave assisted extraction and gamma irradiation on sesquiterpene lactones in *T. garganica* extracts

Materials and methods: To evaluate the combined effect of microwave assisted extraction and gamma irradiation on the highly bioactive compounds found in extracts of Algerian *T. garganica*, samples from different locations in Algeria were prepared by extraction from dried leaf and root samples of dried plant material, using different extraction methods. Quantification of the compounds of interest was done using an HPLC. The antioxidant activity extracts was determined using the two free radical scavenging assays: the 2,2-diphenyl-picryl-hydrazyl (DPPH) and the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt (ABTS).

Results: It was found that location and extraction method had significant impact on the phytochemical composition of extracts. Gamma irradiation was found to have no effect on the phytochemical composition of the plant extracts or on their antioxidant properties.

Conclusion: The study has shown that microwave assisted extraction is an effective method for investigating chemical compounds in *T. garganica* and the results support the notion that gamma irradiation for sterilisation do not alter the chemical composition.

The authors wish to clarify that we cannot recommend the usage of any parts of *T. garganica*, in any form, for any remedy due to its very high toxicity.

1. Introduction

1.1. Traditional use in Algeria

Thapsia garganica L. (Apiaceae) is a medicinal plant commonly found in Algeria, along the coast, in the plains, in the Saharan Atlas Mountains and in the north of the Saharan desert (Hammiche et al.,

2013). It is commonly referred to as: Toufelt in Berber; adhriss by the Kabyle people in the North; thapsie, bounafaa or bou-nafit «that of efficacy» in Arabic; faux fenouil (false fennel) and Thapsia du mont Gargan in French (Hammiche et al., 2013). In English, it is known as the deadly carrot. All parts of the plant are known to be toxic and irritant to the skin, causing blisters, erythema and itching, and the resin of the roots has been found to be particularly toxic (Andersen et al., 2015b).

* Corresponding author.

E-mail address: hets@dtu.dk (H.T. Simonsen).

¹ Authors contributed equally this work.

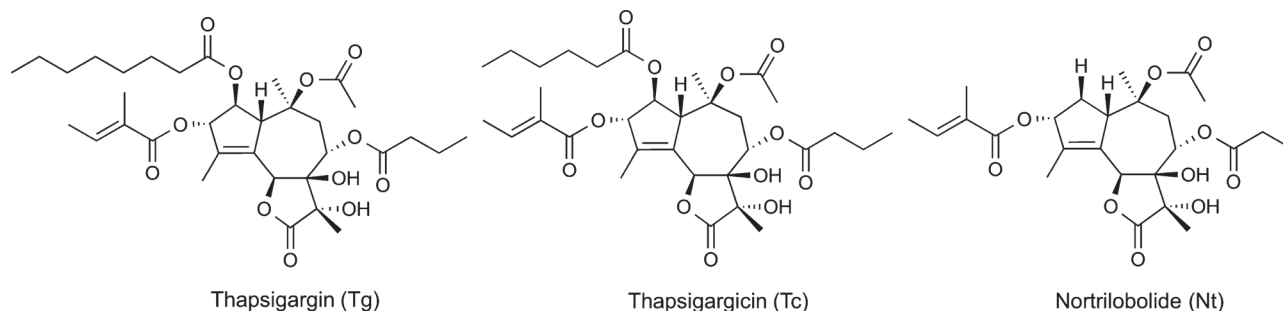


Fig. 1. Illustration of structures of the three main sesquiterpene lactones in *Thapsia garganica* L. Thapsigargin (Tg), thapsigargin (Tc), and nortrilobolide (Nt).

Due to this toxicity *T. garganica* is not allowed in any official pharmaceutical preparation, and we cannot recommend the usage of any parts of *T. garganica*, in any form, for any remedy due to its very high toxicity. *T. garganica* roots are still used in Algerian traditional medicine for a number of ailments. In Kabylia, the Kabyle people use the root to make a “depurative cure” at the onset of spring (Hammiche et al., 2013). They also use the roots to make a poultice, which is applied to the chest as an antitussive treatment of acute bronchitis and pneumonia. Great care is taken in the preparation and its use is limited; in fact, it is a treatment of last resort when bad weather prevents travel (Hammiche, 2015). If the medical condition is less severe, the oil in which a fresh root is cooked is either rubbed on the chest for its “purgative” properties or ingested in small quantities (Hammiche, 2015). Other traditional uses in Algeria include a preparation with milk or oil taken orally to treat common lung diseases, and the soothing of dental pains with the direct application of root sections (Hammiche et al., 2013).

The toxicity of *T. garganica* originates from the presence of thapsigargin (Fig. 1) and other sesquiterpene lactones (Andersen et al., 2015a, 2017; Drew et al., 2009; Simonsen et al., 2013). Thapsigargin makes up 0.2–1.2% of the dry weight of the plant’s roots (Andersen et al., 2015b). The pharmacological activity of thapsigargin is due to its inhibition of the sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) in mammalian cells, which leads to cell apoptosis (Simonsen et al., 2013).

1.2. Antioxidant activity

Both the food and pharmaceutical industries have shown a continuing interest in finding naturally occurring antioxidants for use in the preservation of foods or medicinal products, in order to replace synthetic antioxidants, which are being restricted due to their carcinogenicity and harmful effects on the environment (Prakash et al., 2015). Essential oils from aromatic and medicinal plants, in particular, have been of special interest due to their strong antioxidant activity and antimicrobial constituents in their tissues (Di Venere et al., 2016; Golubović et al., 2014). It has previously been seen that certain Algerian medicinal plants, including *T. garganica*, contain strong radical scavengers and can therefore be useful as sources of natural antioxidants for both medicinal and commercial use (Djeridane et al., 2006). However, as many of these plants contain toxic compounds, toxicity issues need to be addressed to ensure the antioxidants are safe to use.

1.3. Irradiation of medicinal herbs

Medicinal plants are widely used in Algerian folk medicine, especially by the elderly and rural communities with limited access to doctors. However, the plants are subject to deterioration from chemical and microbial processes that occur before reaching the end-user during harvesting, processing, distribution and storage. These processes can alter their efficacy and in some cases their safety, so there is a demand for methods of decontamination and preservation in order to improve consumer safety and therapeutic efficacy. Food irradiation is commonly

used to sterilise and to reduce food losses due to spoilage, and it has replaced once commonly used chemical fumigants, like ethylene oxide, and other chemical preservatives that have been reported to be hazardous to human health (Seo et al., 2007). The use of gamma irradiation on food products is approved by the Food and Agriculture Organisation (FAO), the International Atomic Energy Agency (IAEA) and the World Health Organisation (WHO) (Joint, 2009). It has been shown to be a safe, environmentally friendly and energy efficient method to sterilise plant products. It is also a well-established industrial process for the sterilisation of medicinal plants in a number of facilities worldwide and in general do not affect the chemical composition of the leaves and roots (Garg and Gupta, 2016; Seo et al., 2007).

1.4. Extraction methods

Traditional extraction methods of medicinal plants include decoction or maceration in an organic solvent. These methods however, are highly energy dependent and time consuming. Microwave assisted extraction (MAE) has been found to be a reliable alternative as it requires a lower energy input to result in the same or even higher extraction yields, reduces the use organic solvents, shortens extraction times and improves the reproducibility of results. This extraction method has been used for the analysis of bioactive compounds in a number of medicinal plants (Akloul et al., 2014; Benkaci-Ali et al., 2006; Kennouche et al., 2015). However, care should be taken to choose suitable conditions to avoid the thermal degradation of the analytes of interest. Sample preparation and extraction methods are important to consider when studying medicinal plants, as the methods chosen depend on the target compounds and can affect the phytochemical composition of the final extracts.

Here we investigate the chemical composition of extracts of *T. garganica* from different regions in Algeria. We evaluate the combined effects of microwave assisted extraction and gamma irradiation on the extraction yield of the bioactive compounds as well as on the antioxidant activity of the extract.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Thapsia garganica L. (Apiaceae) roots and leaves were collected between March and April in 2014 and 2015 during flowering, from two locations in Algeria: Médea (Ain Boucif) (GPS coordinates N35° 53' 28"/E3° 9' 31") and Béjaia (Kherrata) (GPS coordinates N36° 29' 34"/E5° 16' 39"). At each site 50 individuals were sampled. For each individual representative leaf material was taken across the entire plant and roots were dug out. Herbarium vouchers were made for one individual per site. The herbarium vouchers are deposited at the Natural History Museum of Denmark, Herbarium C (C10011584, C10011585; leg. Abir Mohamed Ibrahim). The local name, the used plant parts, methods of preparation and administration, and medicinal uses were collected from local inhabitants. Samples were identified Dr. Abdelkrim

of the Botanical department at the National School Agronomic, Algiers, Algeria, air-dried and stored at room temperature in the laboratory of chemistry. The collections were made according to Algerian regulations.

2.2. DNA extraction, amplification and sequencing

The taxonomy and species concept of *Thapsia* is not resolved (Weitzel et al., 2014), thus to confirm the identity of the collected samples, total genomic DNA from one sample per site (herbarium accession numbers: C10011584, C10011585) was extracted from 15 mg of dried leaf fragments, using the QiagenDNeasy Kit (Qiagen, Copenhagen, Denmark) following the manufacturer's protocol. The nuclear ribosomal internal transcribed spacer (nrITS) region was sequenced as described previously (Weitzel et al., 2014), using primers ITS4 and ITS5. Sequences were edited and assembled using CLC Main Workbench 7 software. BLAST analysis confirmed material from both sites to be *T. garganica* (99% match) as previously identified (Weitzel et al., 2014). The new sequences generated are deposited in GenBank, with the following accession numbers: (submitted to GenBank).

2.3. Irradiation

200 g of dried root and leaf samples were subjected to the following doses (D) of gamma radiation (values in KGy): D₁:0.1, D₂:0.3, D₃:0.7, D₄:1, D₅:3, D₆:7 and D₇:10; at room temperature in the Centre of Nuclear Research Algiers, Algeria (Centre de Recherche Nucléaire d'Alger, CRNA) with a ⁶⁰Co source. Non-irradiated (D₀:0 kGy) samples were used as negative controls. The irradiated samples were kept in the dark and at room temperature (ca 22 °C) until analysis.

2.4. Extraction and fractionation of plant material of *T. garganica* for HPLC quantification

The individual samples of leaves and roots collected at each site were pooled to make a representative sample of leaves and roots for each area.

2.4.1. Simple extraction (SE)

1.5 mL of organic solvent (1:1 mixture of 80% MeOH in water and 80% Acetone in water) was added to 50 mg of homogenised dried and ground plant material using liquid nitrogen (–196 °C) to preserve the samples, then vortexed thoroughly and agitated overnight in a thermomixer (Eppendorf® Thermomixer Compact) at 850 rpm at 25 °C. Samples were then centrifuged for 10 min at 10,000 rpm 1 mL of the supernatant was evaporated to total dryness in a vacuum concentrator (Scan Speed Maxi Vac Evaporator). 250 µL of 80% methanol was then added to re-suspend the extract for HPLC analysis.

2.4.2. Classical maceration (CM)

40 g samples of dried and ground roots and leaves (irradiated and untreated) of *T. garganica* were submerged in 100 mL of methanol at 40 °C for 10 h under magnetic stirring. After filtration, the methanol extracts were concentrated under reduced pressure to obtain crude extracts and then lyophilized to eliminate all trace of solvent and stored at 4 °C. Before HPLC analysis, 1 mg of each sample was re-suspended in 1 mL 100% methanol.

2.4.3. Microwave assisted extraction (MAE)

40 g of each dried sample (irradiated and untreated) were ground to powder. Samples were then extracted in 100 mL methanol in a microwave device as previously described (Akloul et al., 2014) for 30 min. The resultant mixture was filtered under vacuum and the filtrate was evaporated to near dryness. The samples were then completely lyophilized and stored at 4 °C. 1 mg of each dry extract was re-suspended in 1 mL 100% methanol before HPLC analysis.

2.5. Chemical standards

Standards extracted from the fruits of *T. garganica* were used as references for the identification and quantification of thapsigargin (Tg), nortrilobolide (Nb) and thapsigargin (Tc) (donated by Søren Brøgger Christensen, University of Copenhagen, Denmark). Standard solutions were prepared in triplicate, diluted in 80% methanol (standard dilutions: 5, 25, 50, 200, 400, 500, 600, 800, 1000 µg/mL).

2.6. HPLC analysis

All samples were filtered in centrifugal filters (Ultrafree® MC GV, 0.22 µm Durapore® PVDF) just before injection into the HPLC. HPLC analysis was performed on an Analytical HPLC-UV Shimadzu Prominence (column oven 30 °C, autosampler 15 °C) and performed on a Kinetix EVO C18 100A column (5 µm, 50 mm × 3 mm; Phenomenex). Acetonitrile (solution A) and milliQ water (solution B) were used as the mobile phase with a flow rate of 0.5 mL/min. The gradient program was as follows: 50% A (0–1 min, linear gradient), 100% A (6–9 min, linear gradient), 5% A (14–16 min, linear gradient), 50% A (17–23 min, linear gradient) the flow rate was fixed at 0.5 mL/min. Eluting compounds were detected with UV at 230 nm. Each sample was prepared in triplicate and 10 µL was injected into the HPLC. Calibration curves were generated based on triplicate analysis. To obtain a standard curve for quantification, the calibration graphs were linear in the concentration range 5–1000 µg/mL. The calibration curves for each standard had a correlation coefficient of 0.999.

2.7. Antioxidant activity

The antioxidant potential of *T. garganica* root and leaf extracts was determined using the two most widely used free radical scavenging assays: the 2,2-diphenyl-picryl-hydrazyl (DPPH) and the 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt (ABTS). All experiments were performed in triplicate for the different concentrations of each plant extract.

DPPH assay: The free radical scavenging capability of each extract solution was measured from the bleaching of a purple solution of DPPH as described previously (Şahin et al., 2004). 1 mL of methanol solution of 60 µM DPPH was mixed with 26 µL of each of the methanolic extracts of the roots and leaves at different concentrations, 100–1000 mg/mL and 25–200 mg/mL respectively. The reaction mixture was carried out in capped glass test tubes. After 30 min of incubation at room temperature, the absorbance was measured at 517 nm using an optizen Mecasys spectrophotometer. The inhibition percentage of DPPH free radicals (I%) was calculated as follows:

$$I\% = (A_0 - A_S/A_0) \times 100$$

The DPPH· stock solution was freshly prepared before each reaction to reduce the loss of free radical activity during the experiment.

ABTS assay: The ABTS method followed (Scalzo et al., 2005) and is based on the capacity of the test samples to scavenge the coloured ABTS radical cation (green ABTS·⁺), obtained by oxidation with potassium persulphate solution for 12–16 h at 4 °C away from light. The absorption peak of ABTS·⁺ is at 734 nm and the addition of antioxidants reduces it to its colourless form. On the day of the assay, the ABTS·⁺ solution was diluted with ethanol until absorbance of 1.00 ± 0.02 at 734 nm 25 µL of sample extracts were added to 1 mL of the ABTS·⁺ solution. The decrease in absorbance was measured after 7 min of incubation at 734 nm. Ethanol was used to set the zero. The radical scavenging activity of the samples tested, expressed as a percentage of the inhibition of ABTS·⁺ (I%), were calculated using the formula:

$$I\% = [(A_0 - A_S)/A_0] \times 100$$

For both assays, a linear regression was determined and used to

calculate the IC_{50} value. Low IC_{50} values indicate greater antioxidant activity.

3. Results and discussion

All results presented are averages (\pm SD) of three repetitions. The treatments were compared by performing a Two-Way factorial ANOVA (Analysis of Variance) on the phytochemical composition of the extracts and a Two-Way ANOVA on the antioxidant activities measured. This was followed by the post-hoc Tukey HSD (honest significant difference) test (95% confidence level) to compare the effect of different conditions on the parameters measured. Values of $p < 0.05$ were accepted as significant. The ANOVA analyses were performed in R, Tukey HSD with the R package agricolae (De Mendiburu, 2014) and the graphs were made using the R package ggplot2 (Wickham, 2009).

3.1. Effect of the gamma irradiation and extraction technique on the phytochemical composition in thapsigargin

The results show that across all the three extraction methods, gamma irradiation had no significant effect on the phytochemical composition of the extracts obtained from *T. gargarica* (Fig. 2A, Table 1, Table 2). Thapsigargin is today isolated from plant grown in Ibiza (Spain) and shipped around the world for extraction. We can suggest that in the future the plant material can be safely sterilised by gamma irradiation and thereby add to the conservation of the product during

transport.

Fig. 2B illustrates the effect of the extraction methods on the chemical extracts, which was found to be significantly different from each other in both root extracts (F-value = 7.21, P-value = 0.001) and leaves extracts (F-value = 4.47, P-value = 0.01) (Table 2). Simple extraction with liquid nitrogen (SE) of dried *T. gargarica* roots and leaves proved to be the least effective method to extract bioactive compounds from small amounts of plant material, with no significant difference between microwave assisted extraction (MAE) and classical maceration (CM). MAE however presents the advantage of being rapid and reproducible as well as requiring less energy than conventional methods like CM (Azwanida, 2015). MAE is known to cause the thermal degradation of certain analytes, but in here, it has been shown to be a suitable method for the extraction of thapsigargin as previously suggested (Benkaci-Ali et al., 2006). The only chemical variations observed between the different extracts were that the Tg content in both the leaves and the roots was higher than Tc and Nt; dried roots of *T. gargarica* have significantly higher levels of Tg than in the dried leaves ($P < 0.00$, Fig. 2B). Nt was the least abundant compound in all the samples. This has already been reported (Smitt et al., 1995), but new localities have been investigated in this study. Clear differences were also seen between the two study regions for the roots only, with the root extracts from the Béjaia region consistently having larger quantities of the three compounds studied (Fig. 2B). Locality has previously been shown to have an effect on the phytochemical composition of *T. gargarica* roots (Drew et al., 2012; Smitt et al., 1995), but the cause(s) of

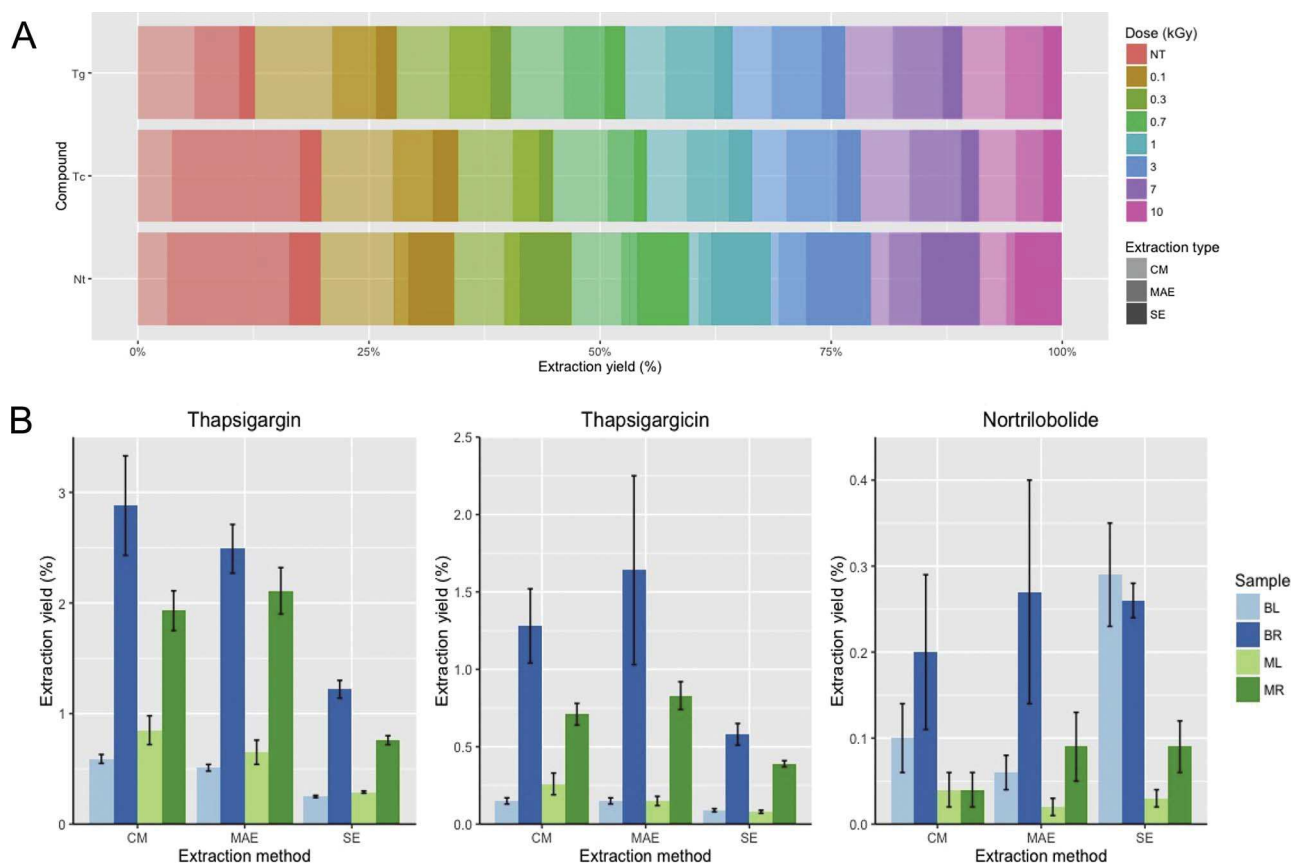


Fig. 2. A – Stacked bar chart showing the effect of gamma irradiation on Thapsigargin (Tg), thapsigarginin (Tc) and nortrilololide (Nt) levels in the different extracts obtained by the different extraction methods. The dose of irradiation used is shown in kGy with the control (NT = no treatment) and each dosage extraction is represented in a different color. The amounts presented are relative to the individual samples run. For each irradiation dosage, the extraction methods are represented with shading with the lightest shading being classical maceration (CM), the middle shading is microwave assisted extraction (MAE) and the darkest shading is simple extraction (SE). The size of the bars indicates the percentage of extraction yield, each treatment is responsible for, relative to each compound.

B – Bar plots to show the effect of the extraction methods used on the extraction yield of thapsigargin (Tg), thapsigarginin (Tc), and nortrilololide (Nt) on samples from the two locations. MR = Médéa roots, ML = Médéa leaves, BR = Béjaia roots, BL = Béjaia leaves.

In both charts, the amount of the compounds was calculated as the percentage of the compound in the dry weight of the plant material (extraction yield).

Table 1
effect of extraction method and gamma irradiation doses on the yield of thapsigargin (%DW) in samples of *T. garganica*.

	KGy	MR	ML	BR	BL	MR	ML	BR	BL	MR	ML	BR	BL
	Classical Maceration					Microwave Assisted Extraction				Simple Extraction			
Tg	0	1.87 ± 0.25 ^{ag}	0.62 ± 0.09 ^b	4.28 ± 1.24 ^{cg}	0.45 ± 0.08 ^d	2.44 ± 1.85 ^{ch}	0.37 ± 0.21	2.40 ± 3.66 ^{fh}	0.50 ± 0.09	0.51 ± 0.89 ^{aei}	0.28 ± 0.22 ^b	1.09 ± 0.36 ^{cfi}	0.19 ± 0.15 ^d
	0.1	2.99 ± 0.43 ^{ag}	1.47 ± 0.10 ^b	4.91 ± 0.64 ^{cg}	0.47 ± 0.34 ^d	2.93 ± 0.60 ^{ch}	0.32 ± 0.04	1.99 ± 0.31 ^{fh}	0.34 ± 0.09	0.72 ± 0.57 ^{aei}	0.26 ± 0.21 ^b	1.48 ± 0.11 ^{cfi}	0.18 ± 0.15 ^d
	0.3	1.79 ± 0.34 ^{ag}	0.53 ± 0.05 ^b	3.68 ± 0.88 ^{cg}	0.77 ± 0.39 ^d	1.33 ± 0.26 ^{ch}	0.63 ± 0.02	2.74 ± 0.96 ^{fh}	0.51 ± 0.13	0.73 ± 0.55 ^{aei}	0.30 ± 0.23 ^b	1.36 ± 0.25 ^{cfi}	0.28 ± 0.23 ^d
	0.7	1.91 ± 0.30 ^{ag}	0.53 ± 0.44 ^b	2.21 ± 0.17 ^{cg}	0.44 ± 0.09 ^d	2.36 ± 0.64 ^{ch}	0.53 ± 0.07	2.66 ± 0.32 ^{fh}	0.64 ± 0.07	0.82 ± 0.60 ^{aei}	0.32 ± 0.25 ^b	0.98 ± 0.31 ^{cfi}	0.28 ± 0.18 ^d
	1	1.32 ± 0.49 ^{ag}	0.96 ± 0.39 ^b	2.12 ± 1.89 ^{cg}	0.63 ± 0.33 ^d	1.43 ± 0.58 ^{ch}	1.10 ± 0.33	3.32 ± 0.30 ^{fh}	0.48 ± 0.10	0.82 ± 0.64 ^{aei}	0.32 ± 0.25 ^b	1.56 ± 0.29 ^{cfi}	0.28 ± 0.24 ^d
	3	2.18 ± 0.28 ^{ag}	0.62 ± 0.18 ^b	2.73 ± 0.16 ^{cg}	0.59 ± 0.08 ^d	2.06 ± 0.25 ^{ch}	0.51 ± 0.14	3.27 ± 0.36 ^{fh}	0.60 ± 0.09	0.81 ± 0.60 ^{aei}	0.26 ± 0.19 ^b	1.11 ± 0.32 ^{cfi}	0.24 ± 0.19 ^d
	7	1.80 ± 0.26 ^{ag}	1.37 ± 0.31 ^b	1.72 ± 0.11 ^{cg}	0.67 ± 0.13 ^d	1.65 ± 0.13 ^{ch}	1.11 ± 0.31	1.60 ± 1.29 ^{fh}	0.48 ± 0.21	0.87 ± 0.67 ^{aei}	0.29 ± 0.23 ^b	1.02 ± 0.24 ^{cfi}	0.26 ± 0.21 ^d
	10	1.54 ± 1.03 ^{ag}	0.73 ± 0.07 ^b	1.41 ± 0.13 ^{cg}	0.67 ± 0.03 ^d	2.70 ± 0.60 ^{ch}	0.61 ± 0.07	1.96 ± 0.24 ^{fh}	0.53 ± 0.10	0.82 ± 0.60 ^{aei}	0.31 ± 0.23 ^b	1.18 ± 0.19 ^{cfi}	0.28 ± 0.23 ^d
Tc	0	0.57 ± 0.35 ^{ag}	0.09 ± 0.04 ^b	1.07 ± 0.53 ^{cg}	0.14 ± 0.08 ^d	1.13 ± 0.35 ^{ch}	0.13 ± 0.14	5.68 ± 5.52 ^{fh}	0.20 ± 0.08	0.47 ± 0.10 ^{aei}	0.11 ± 0.09 ^b	0.54 ± 0.25 ^{cfi}	0.05 ± 0.04 ^d
	0.1	1.09 ± 0.23 ^{ag}	0.46 ± 0.12 ^b	2.38 ± 0.28 ^{cg}	0.07 ± 0.07 ^d	1.12 ± 0.22 ^{ch}	0.06 ± 0.01	0.89 ± 0.12 ^{fh}	0.15 ± 0.07	0.32 ± 0.28 ^{aei}	0.07 ± 0.07 ^b	0.87 ± 0.15 ^{cfi}	0.13 ± 0.09 ^d
	0.3	0.67 ± 0.10 ^{ag}	0.13 ± 0.07 ^b	2.05 ± 0.49 ^{cg}	0.22 ± 0.19 ^d	0.50 ± 0.07 ^{ch}	0.15 ± 0.07	0.68 ± 0.29 ^{fh}	0.13 ± 0.06	0.35 ± 0.29 ^{aei}	0.07 ± 0.06 ^b	0.30 ± 0.53 ^{cfi}	0.01 ± 0.08 ^d
	0.7	0.73 ± 0.11 ^{ag}	0.16 ± 0.22 ^b	1.25 ± 0.08 ^{cg}	0.09 ± 0.04 ^d	0.89 ± 0.19 ^{ch}	0.14 ± 0.07	1.04 ± 0.67 ^{fh}	0.24 ± 0.08	0.32 ± 0.33 ^{aei}	0.10 ± 0.08 ^b	0.78 ± 0.12 ^{cfi}	0.10 ± 0.07 ^d
	1	0.50 ± 0.17 ^{ag}	0.21 ± 0.12 ^b	1.01 ± 0.96 ^{cg}	0.19 ± 0.15 ^d	0.56 ± 0.23 ^{ch}	0.26 ± 0.18	1.85 ± 0.19 ^{fh}	0.13 ± 0.09	0.40 ± 0.38 ^{aei}	0.07 ± 0.06 ^b	0.73 ± 0.64 ^{cfi}	0.10 ± 0.08 ^d
	3	0.83 ± 0.13 ^{ag}	0.21 ± 0.12 ^b	1.54 ± 0.07 ^{cg}	0.14 ± 0.05 ^d	0.79 ± 0.08 ^{ch}	0.07 ± 0.01	1.86 ± 0.23 ^{fh}	0.17 ± 0.10	0.38 ± 0.31 ^{aei}	0.06 ± 0.05 ^b	0.43 ± 0.45 ^{cfi}	0.10 ± 0.08 ^d
	7	0.68 ± 0.09 ^{ag}	0.63 ± 0.21 ^b	0.54 ± 0.03 ^{cg}	0.21 ± 0.09 ^d	0.63 ± 0.04 ^{ch}	0.29 ± 0.07	0.46 ± 0.39 ^{fh}	0.15 ± 0.15	0.47 ± 0.42 ^{aei}	0.07 ± 0.05 ^b	0.43 ± 0.05 ^{cfi}	0.09 ± 0.08 ^d
	10	0.59 ± 0.36 ^{ag}	0.19 ± 0.07 ^b	0.41 ± 0.07 ^{cg}	0.10 ± 0.02 ^d	1.03 ± 0.22 ^{ch}	0.11 ± 0.01	0.62 ± 0.09 ^{fh}	0.06 ± 0.08	0.37 ± 0.28 ^{aei}	0.09 ± 0.08 ^b	0.59 ± 0.13 ^{cfi}	0.10 ± 0.08 ^d
Nt	0	0.01 ± 0.20 ^{ag}	0.10 ± 0.16 ^b	0.27 ± 0.50 ^{cg}	0.01 ± 0.27 ^d	0.33 ± 0.70 ^{ch}	0.10 ± 0.21	1.14 ± 1.32 ^{fh}	0.07 ± 0.01	0.13 ± 0.25 ^{aei}	0.13 ± 0.13 ^b	0.15 ± 0.12 ^{cfi}	0.01 ± 0.01 ^d
	0.1	0.19 ± 0.24 ^{ag}	0.02 ± 0.94 ^b	0.76 ± 0.53 ^{cg}	0.01 ± 0.33 ^d	0.01 ± 0.12 ^{ch}	0.01 ± 0.40	0.11 ± 0.16 ^{fh}	0.07 ± 0.36	0.01 ± 0.01 ^{aei}	0.01 ± 0.01 ^b	0.33 ± 0.05 ^{cfi}	0.27 ± 0.33 ^d
	0.3	0.01 ± 0.02 ^{ag}	0.16 ± 0.41 ^b	0.18 ± 0.07 ^{cg}	0.32 ± 0.92 ^d	0.10 ± 0.23 ^{ch}	0.01 ± 0.00	0.04 ± 0.10 ^{fh}	0.06 ± 0.44	0.17 ± 0.32 ^{aei}	0.01 ± 0.00 ^b	0.31 ± 0.13 ^{cfi}	0.20 ± 0.38 ^d
	0.7	0.01 ± 0.04 ^{ag}	0.01 ± 0.19 ^b	0.10 ± 0.02 ^{cg}	0.01 ± 0.54 ^d	0.02 ± 0.65 ^{ch}	0.01 ± 0.00	0.07 ± 0.05 ^{fh}	0.08 ± 0.75	0.21 ± 0.38 ^{aei}	0.03 ± 0.09 ^b	0.26 ± 0.23 ^{cfi}	0.30 ± 0.00 ^d
	1	0.01 ± 0.17 ^{ag}	0.01 ± 0.00 ^b	0.01 ± 0.38 ^{cg}	0.07 ± 0.97 ^d	0.04 ± 0.17 ^{ch}	0.01 ± 0.00	0.16 ± 0.05 ^{fh}	0.16 ± 0.52	0.11 ± 0.15 ^{aei}	0.01 ± 0.00 ^b	0.21 ± 0.18 ^{cfi}	0.53 ± 0.63 ^d
	3	0.01 ± 0.04 ^{ag}	0.01 ± 0.06 ^b	0.22 ± 0.04 ^{cg}	0.01 ± 0.73 ^d	0.08 ± 0.34 ^{ch}	0.01 ± 0.00	0.34 ± 0.13 ^{fh}	0.01 ± 0.16	0.01 ± 0.16 ^{aei}	0.01 ± 0.00 ^b	0.31 ± 0.17 ^{cfi}	0.46 ± 0.53 ^d
	7	0.06 ± 0.19 ^{ag}	0.01 ± 0.20 ^b	0.01 ± 0.04 ^{cg}	0.27 ± 0.66 ^d	0.04 ± 0.20 ^{ch}	0.01 ± 0.08	0.06 ± 0.41 ^{fh}	0.01 ± 0.50	0.01 ± 0.00 ^{aei}	0.01 ± 0.01 ^b	0.29 ± 0.20 ^{cfi}	0.32 ± 0.51 ^d
	10	0.01 ± 0.17 ^{ag}	0.01 ± 0.00 ^b	0.08 ± 0.19 ^{cg}	0.07 ± 0.78 ^d	0.09 ± 0.42 ^{ch}	0.01 ± 0.00	0.25 ± 0.08 ^{fh}	0.01 ± 0.28	0.04 ± 0.09 ^{aei}	0.01 ± 0.00 ^b	0.22 ± 0.25 ^{cfi}	0.25 ± 0.43 ^d

Comparison of the different extraction methods and gamma irradiation doses on the samples from the two study areas Médéa and Béjaïa. Values are the mean of three replicates ± standard deviation (SD) and are expressed as the percentage of compound in the dry weight of the sample (DW%), $P < 0.05$. Tg = Thapsigargin, Tc = Thapsigarginin, Nt = Nortrilobolide, CM = Classical maceration, MAE = Microwave assisted extraction, SE = Simple extraction with liquid nitrogen, MR = Médéa roots, ML = Médéa leaves, BR = Béjaïa roots, BL = Béjaïa leaves. Gamma irradiation doses are given in KGy, significance $P < 0.05$ is compared to the control 0 KGy. Superscript letters within the same row indicate significant ($P < 0.05$) differences in the compound yields between the extraction methods.

Table 2
ANOVA results.

Source of variation	df Roots	Sum sq	Mean sq	F _s	Pr(> F)	df Leaves	Sum sq	Mean sq	F _s	Pr(> F)
γ-irradiation	7	5.73	0.82	0.78	0.61	7	0.30	0.04	0.55	0.80
Extraction method	2	15.21	7.60	7.21	0.0011**	2	0.70	0.35	4.47	0.014*
Locality	1	9.67	9.67	9.17	0.0031**	1	0.01	0.01	0.10	0.75
Extraction:Locality	2	1.21	0.60	0.57	0.57	2	0.15	0.08	0.96	0.39
γ-irradiation:Extraction	14	9.57	0.68	0.65	0.82	14	0.37	0.02	0.34	0.99
γ-irradiation:Locality	7	2.94	0.42	0.40	0.90	7	0.21	0.03	0.39	0.91

Factorial two-way analysis of variance on the effect of γ-irradiation (gamma irradiation), extraction method and locality on the chemical variation of the extracts from *T. garganica* with significance displayed as *** P > 0.00, ** P > 0.001, * P > 0.01. df = ° of freedom, Sum sq = sum of squares, Mean sq = mean square, F_s = F statistic.

Table 3
Antioxidant activity of *T. garganica* extracts after gamma irradiation at different doses.

KGy	DPPH IC ₅₀ (mg/L)				ABTS IC ₅₀ (mg/L)			
	MR	ML	BR	BL	MR	ML	BR	BL
0	990 ± 13.31	70 ± 2.63	379 ± 10.40	36 ± 0.38	198 ± 6.06	50 ± 0.10	200 ± 10.79	40 ± 1.29
0.1	926 ± 0.91	50 ± 0.68	413 ± 3.26	40 ± 0.51	198 ± 0.51	53 ± 0.88	180 ± 1.06	23 ± 3.98
0.3	808 ± 1.72	59 ± 0.91	559 ± 4.90	38 ± 1.40	169 ± 0.13	52 ± 0.17	196 ± 7.89	28 ± 6.36
0.7	790 ± 0.10	52 ± 1.11	450 ± 1.23	45 ± 2.50	199 ± 0.02	49 ± 3.47	176 ± 0.83	49 ± 5.29
1	789 ± 6.03	44 ± 0.55	518 ± 10.80	44 ± 0.19	188 ± 3.57	48 ± 3.64	200 ± 9.55	44 ± 0.78
3	993 ± 1.01	58 ± 0.83	491 ± 11.90	47 ± 0.85	194 ± 9.05	50 ± 1.50	150 ± 8.05	44 ± 0.24
7	722 ± 14.26	48 ± 0.19	611 ± 3.74	52 ± 0.72	214 ± 8.98	43 ± 1.39	182 ± 2.40	55 ± 1.55
10	600 ± 21.13	51 ± 1.53	559 ± 12.48	52 ± 1.79	231 ± 9.84	46 ± 0.90	110 ± 4.92	47 ± 0.94

The effect of gamma irradiation on the antioxidant activity of samples obtained by CM with methanol. Values are represented as the mean IC₅₀ (mg/L) value of three replicates ± standard deviation at 5% significance level. DPPH = 2,2-diphenyl-picryl-hydrazyl assay, ABTS = 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt assay. Gamma irradiation dosages (D) are given in KGy. MR = Médéa roots, ML = Médéa leaves, BR = Béjaia roots, BL = Béjaia leaves.

these variations have not yet been identified. We hypothesise that there are biological and environmental factors responsible for these fluctuations. Further investigations are needed to determine the best time to harvest *T. garganica* to optimise Tg extraction, considering that the compound remains extremely expensive at € 187 per mg (Sigma-Aldrich).

3.2. Effect of gamma irradiation on the antioxidant properties of *T. garganica*

Gamma irradiation was found to have no significant effect on the antioxidant activity of *T. garganica* root extracts (Table 3). However, there was significant difference between the scavenging activities of both leaf and root extracts between the Médéa and Béjaia regions, for both the ABTS^{•+}, leaves (F-value = 4.97, P-value = 0.05), roots (F-value = 8.68, P-value = 0.01) and DPPH assays, leaves (F-value = 9.66, P-value = 0.01), roots (F-value = 59.77, P-value = 0.00). It was noted that IC₅₀ values for the DPPH assay were higher than those obtained with the ABTS^{•+} assay for the root extracts (Table 3). It has been previously shown that DPPH assays are a rapid and reliable test for the antioxidant capacity of plant extracts, but also an advantageous assay applicable to both hydrophilic and lipophilic environments. The leaf extracts had a much higher scavenging activity than the root extracts with those from the Béjaia region generally higher than the extracts from Médéa. This again shows that there are biological or environmental factors responsible for these fluctuations. As *T. garganica* and other Algerian medicinal plants have been proposed as potential sources of natural antioxidants (Djeridane et al., 2006). This shows that whilst gamma irradiation can be used as a sterilisation method, the locality where a plant is collected can affect its antioxidant potential.

4. Conclusion

A difference in the chemical composition of Thapsigargin was

observed between different tissues of *T. garganica*. The highest amount of Thapsigargin was found to be in the roots of samples collected in Béjaia. There was a significant effect of locality on the phytochemical composition of the roots but not in the leaves. Locality also affected the antioxidant properties of both the leaf and root extracts.

Of the extraction methods used, MAE and CM were equally effective and more efficient than SE to extract bioactive compounds from small amounts of plant material. Gamma irradiation had no significant effect on the phytochemical composition of *T. garganica* as well as the antioxidant activity of the extracts.

Author contributions

A. Mohamed Mohamed Ibrahim and K. A. Martinez-Swatson established the major part of the results and contributed equally to the manuscript. A. Mohamed Mohamed Ibrahim conducted fieldwork for collects of samples and extraction, prepared samples for HPLC analysis, conducted the antioxidant activity test. K.A. Martinez purified the chemical compounds used as standards and ran the HPLC analysis. F. Cozzi directed and supported the HPLC analysis. F. Benkaci-Ali conceived the project and contributed to the manuscript. F. Zoulikha supervised the writing. H. T. Simonsen initiated, directed and supported the research and writing of the manuscript. All authors edited and approved the final manuscript.

Acknowledgments

This work was supported by Department of Food Technology, Laboratory of Food Technology and Humane nutrition, National School Agronomic (ENSA) (AMMI, FB-A) and by MEDPLANT, a Marie Curie Actions Initial Network grant #606895 (KAM). We would like to thank Centre of Nuclear Research Algiers, (CNRA) for providing the Gamma Ray irradiation. The Standards were extracted and purified under the direction of Søren Brøgger Christensen and Huizhen Liu at the Department of Drug Design and Pharmacology, University of Copenhagen, Denmark.

References

- Şahin, F., Güllüce, M., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M., Polissiou, M., Agar, G., Özer, H., 2004. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control* 15 (7), 549–557.
- Akloul, R., Benkaci-Ali, F., Eppe, G., 2014. Kinetic study of volatile oil of *Curcuma longa* L. rhizome and *Carum carvi* L. fruits extracted by microwave-assisted techniques using the cryogrinding. *Journal of Essential Oil Research* 26 (6), 473–485.
- Andersen, T.B., Cozzi, F., Simonsen, H.T., 2015a. Optimization of biochemical screening methods for volatile and unstable sesquiterpenoids using HS-SPME-GC-MS. *Chromatography* 2 (2), 277–292.
- Andersen, T.B., Lopez, C.Q., Manczak, T., Martinez, K.A., Simonsen, H.T., 2015b. Thapsigargin –from *Thapsia* L. to mipsagargin. *Molecules* 20 (4), 6113–6127.
- Andersen, T.B., Martinez, K.A., Rasmussen, S.A., Boughton, B.A., Jørgensen, K., Andersen-Ranberg, J., Nyberg, N., Christensen, S.B., Simonsen, H.T., 2017. Localization and in-vivo characterization of *Thapsia garganica* CYP76AE2 indicates a role in thapsigargin biosynthesis. *Plant Physiology* 174 (1), 56–72.
- Azwanida, N.N., 2015. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Medicinal Aromatics Plants* 4 (196), 196. <http://dx.doi.org/10.4172/2167-0412.1000196>.
- Benkaci-Ali, F., Baaliouamer, A., Meklati, B.Y., 2006. Kinetic study of microwave extraction of essential oil of *Nigella sativa* L. seeds. *Chromatographia* 64 (3–4), 227–231.
- De Mendiburu, F., 2014. *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*. < <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae> > (Accessed October 2016).
- Di Venere, D., Gatto, M.A., Ippolito, A., Bianco, V.V., 2016. Antimicrobial Potential of Wild Edible Herbaceous Species, Mediterranean Wild Edible Plants. Springer, pp. 233–252.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N., 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry* 97 (4), 654–660.
- Drew, D.P., Krichau, N., Reichwald, K., Simonsen, H.T., 2009. Guaianolides in Apiaceae: perspectives on pharmacology and biosynthesis. *Phytochemistry Reviews* 8 (3), 581–599.
- Drew, D.P., Rasmussen, S.K., Avato, P., Simonsen, H.T., 2012. A comparison of headspace solid-phase microextraction and classic hydrodistillation for the identification of volatile constituents from *Thapsia* spp. provides insights into guaianolide biosynthesis in Apiaceae. *Phytochemical Analysis* 23 (1), 44–51.
- Garg, N., Gupta, P.C., 2016. *Irradiation: A Technique for Microbial Decontamination of Medicinal Plants, Microbes in Food and Health*. Springer, pp. 225–237.
- Golubović, T., Palić, R., Kitić, D., Stojanović, G., Zlatković, B., Ristić, M., Pavlović, D., 2014. Composition, antioxidant and antimicrobial activities of methanol extracts of some *Acinos* Miller species. *Natural Product Communications* 9 (5), 731–735.
- Hammiche, V., Merad, R., Azzouz, M., 2013. *Plantes Toxiques à Usage Médicinal Du Pourtour méditerranéen*. Springer, Paris.
- Hammiche, V., 2015. Traitement de la toux à travers la pharmacopée traditionnelle kabyle. *Phytothérapie* 13 (6), 358–372.
- Joint FAO, 2006. *Irradiation to Ensure the Safety and Quality of Prepared Meals. Results of the Coordinated Research Project (2002–2006)*. International Atomic Energy Agency, Vienna, pp. 1–375.
- Kennouche, A., Benkaci-Ali, F., Scholl, G., Eppe, G., 2015. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* cloves extracted by conventional and microwave techniques. *Journal of Biologically Active Products from Nature* 5 (1), 1–11.
- Prakash, B., Kedia, A., Mishra, P.K., Dubey, N.K., 2015. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities—potentials and challenges. *Food Control* 47, 381–391.
- Scalzo, J., Politi, A., Pellegrini, N., Mezzetti, B., Battino, M., 2005. Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. *Nutrition* 21 (2), 207–213.
- Seo, H.-Y., Kim, J.-H., Song, H.-P., Kim, D.-H., Byun, M.-W., Kwon, J.-H., Kim, K.-S., 2007. Effects of gamma irradiation on the yields of volatile extracts of *Angelica gigas* Nakai. *Radiation Physics and Chemistry* 76 (11), 1869–1874.
- Simonsen, H.T., Weitzel, C., Christensen, S.B., 2013. Guaianolide sesquiterpenoids – their pharmacology and biosynthesis. In: Ramawat, K.G., Merillon, J.M. (Eds.), *Handbook of Natural Products – Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 3069–3098.
- Smitt, U.W., Jäger, A.K., Adersen, A., Gudiksen, L., 1995. Comparative studies in phytochemistry and fruit anatomy of *Thapsia garganica* and *T. transtagana*, Apiaceae (Umbelliferae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 117 (4), 281–292.
- Weitzel, C., Rønsted, N., Spalik, K., Simonsen, H.T., 2014. Resurrecting deadly carrots: towards a revision of *Thapsia* (Apiaceae) based on phylogenetic analysis of nrITS sequences and chemical profiles. *Botanical Journal of the Linnean Society* 174 (4), 620–636.
- Wickham, H., 2009. *Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer, New York.

ملخص

يشكل التوصيف الكيميائي للجزيئات الطبيعية نقطة البداية الأساسية لدراسة التنوع البيولوجي الكيميائي في دراستنا، حيث تم تحديد النوع عن طريق استخراج الحمض النووي وتسجيله في قاعدة البيانات التي تؤكد أنه يتمثل بـ *Thapsia garganica* L. بالنسبة للموقعين (بجاية و مديّة) بدأ العمل بعلاج العينات التي تمت دراستها بواسطة أشعة جاما، لتسليط الضوء على التأثير المشترك للاستخلاص عن طريق المايكرويف ولأشعة جاما على المركبات النشطة بيولوجيا المميزة (thapsigargin) وتحديدًا عن طريق تحليل HPLC. وعلى النشاط المضاد للأكسدة للنبات الذي تم قياسه بواسطة الاختبارين DPPH و ABTS. والتي أظهرت أن الأوراق لها قدرة مضادة للأكسدة أقوى مقارنة بالجذور، لا سيما تلك المقتناه من بجاية. وتستمر الدراسة بتحليل للجذور وللأوراق المعرضة لإشعاع جاما باستخدام تقنية HS-PMEP. أظهرت جميع النتائج أن منطقة اقتناء النبات كان لها الأثر الأكبر على التركيب الكيميائي النباتي لمستخلصات وكذلك طريقة الاستخلاص بينما لم يكن لإشعاع جاما أي تأثير على المظهر الكيميائي للمستخلصات، ولا على خصائصها المضادة للأكسدة. مما يضمن الاستقرار الكيميائي النباتي. خصص الجزء الثاني من هذه الدراسة لتحديد مركبات بذور *T. garganica* المقنتات من جبال Djurdjura باستخدام تقنية HS-SPM التي كانت مشروطة باختيار الألياف (PDMS و PDMS / DVB) ايضا بقطبية وتطابق المركبات وبالمكونات والحالة الفيزيائية للمادة النباتية (الطحن المبرد والطحن التقليدي). اد تم تحديد 124 من المركبات ; الهيدروكربونية والأوكسجينية. فلو حظ تذبذب في إجمالي مناطق الذروة وفقًا لكتلة العينة المختارة لحجم العينة المدروسة 85 و 250 ميكرومتر. هذه الأساليب (الاستخراج بمساعدة الميكرويف و HS-SPME) تتميز بكونها تقنيات نظيفة وسريعة نسبيا.

الكلمات المفتاحية :

Thapsia garganica L. ، أشعة جاما ، HS-SPME ، HPLC ، thapsigargin ، الألياف ، المركبات الهيدروكربونية والأوكسجينية.

Résumé :

Une caractérisation chimique des molécules naturelles constitue le point de départ incontournable de l'étude de la chimiodiversité dans notre travail, où dans un premier lieu, l'espèce a été identifiée par extraction d'ADN et enregistrée dans la base des données affirmant qu'il s'agit et pour les deux endroits de la collecte (Médéa et Béjaia) de *Thapsia garganica* L. Le travail a débuté par un traitement des échantillons étudiés par irradiations gamma, afin de mettre en évidence l'effet combiné de l'extraction assistée par micro-ondes et de l'irradiation gamma sur les composés hautement bioactifs (thapsigargin) présents dans l'espèce et identifiés par l'analyse HPLC et sur l'activité antioxydante de la plante mesurée par les deux test DPPH et ABTS, qui ont montré que les feuilles de *T.garganica* possèdent une capacité anti radicalaire meilleure par rapport aux racines, surtout celles de Béjaia. L'étude se poursuit par une analyse de la volatile des racines et des feuilles de la thapsia irradiées utilisant la technique Head Space-SPME. Tous les résultats ont permis de constater que la localité avait le plus grand effet sur la composition phytochimique des extraits de l'espèce ainsi que sur la méthode d'extraction, alors que l'irradiation gamma n'avait aucun effet sur le profil chimique des extraits végétaux ni sur leurs propriétés antioxydantes; dont il assure une stabilité phytochimique de *T.garganica* traitée.

La seconde partie de cette étude a été consacrée à l'identification des composés des graines de *T. garganica* des monts de Djurdjura en utilisant la technique HS-SPME qui a été fortement conditionnée par le choix de la fibre (PDMS et PDMS / DVB) , par la polarité et la volatilité des composés à étudier et par la composition et l'état physique de la matrice végétale (broyage cryogénique (BCRG) et broyage classique (BCL). Dont 124 composés terpéniques hydrocarbures et oxygénés ont été identifiés, Une fluctuation a été observée dans les surfaces de pics totales selon la masse de l'échantillon choisie pour une taille de particule étudiée de $dp=85$ et $250 \mu m$.

Ces dernières méthodes (extractions assistées par micro-ondes et la HS-SPME) ont donc l'avantage d'être des techniques propres et relativement rapides.

Mots clés : *Thapsia garganica* L., irradiation gamma, HPLC, thapsigargin, HS-SPME, fibre, BCRG, composés terpéniques.

Abstract :

A chemical characterization of the natural molecules constitutes the essential starting point of the study of the chemiodiversity in our work, where in a first place, the species was identified by DNA extraction and registered in the database affirming that it is and for both locations of the collection (Medea and Bejaia) : *Thapsia garganica* L. The work began with a treatment of samples studied by gamma irradiation, to highlight the combined effect of assisted extraction microwaves and gamma irradiation on the highly bioactive compounds (thapsigargin) present in the species and identified by HPLC analysis and on the antioxidant activity of the plant measured by the DPPH and ABTS tests, which showed that *T.garganica* leaves have a better anti-radical capacity compared to the roots, especially those of Bejaia. The study continues with an analysis of the volatile roots and leaves of irradiated thapsia using the Head Space-SPME technique. All results showed that the locality had the greatest effect on the phytochemical composition of the extracts of the species as well as the extraction method, whereas the gamma irradiation had no effect on the chemical profile of the extracts, neither on their antioxidant properties; which it ensures a phytochemical stability of treated *T.garganica*.

The second part of this study was devoted to the identification of *T. garganica* seeds compounds of the Djurdjura mountains using the HS-SPME technique which was strongly conditioned by the choice of fiber (PDMS and PDMS / DVB), by the polarity and volatility of the compounds studied and by the composition and physical state of the plant material (cryogenic grinding (BCRG) and conventional grinding (BCL). Of which 124 terpene hydrocarbon and oxygenated compounds were identified, a fluctuation was observed in the total peak areas according to the mass of the sample chosen for a studied particle size of $dp = 85$ and $250 \mu m$.

These methods (microwave assisted extractions and HS-SPME) have the advantage of being clean and relatively fast techniques.

Keywords : *Thapsia garganica* L., gamma irradiation, HPLC, thapsigargin, HS-SPME, fiber, BCRG, terpene compounds.