

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA -
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2017

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Eau santé et environnement

Présenté par :

DJEFFAL Amel

SMAILI Naouel

Thème

*Etude phytochimique et biologique de deux plantes de genre
Asphodelus: Asphodelus microcarpus et Asphodelus
tenuifolius*

Soutenu le : 01/07 / 2017

Devant le jury composé de :

Nom et Prénom

Grade

Mr. LAMINE Salim

MAA

Univ. de Bouira

Président

Mr. CHIBANE Mohamed

Pr

Univ. de Bouira

Promoteur

Mme. KARBACHE Fatima

MAA

Univ. de Bouira

Examinatrice

Mlle. DAHMOUNE Bouchra

Doctorante

Univ. de Bouira

Co-promotrice

Année Universitaire : 2016/2017

Liste des formules

Numéro	Formules	page
(1)	<ul style="list-style-type: none"> • Le taux d'humidité (H%) $H\% = ((m1 - m2)/m1) \times 100$	22
(2)	<ul style="list-style-type: none"> • Le taux d'extraction (rendement) $R\% = \frac{M \text{ ext}}{M \text{ éch}} \times 100$	25
(3)	<ul style="list-style-type: none"> • L'indice de mousse (IM) $IM = 1000/N$	26
(4)	<ul style="list-style-type: none"> • La Concentrations de la chlorophylle a $C_a (\mu\text{g /ml}) = 13,36A_{664,1} - 5,19A_{648,6}$	27
(5)	<ul style="list-style-type: none"> • La Concentrations de la chlorophylle b $C_b (\mu\text{g /ml}) = 27,43A_{648,6} - 8,12A_{664,1}$	27
(6)	<ul style="list-style-type: none"> • La Concentrations des caroténoïdes $C_{X+C} (\mu\text{g /ml}) = (1000A_{470} - 2,13 C_a - 97,64C_b)/209$	28
(7)	<ul style="list-style-type: none"> • Le pourcentage d'inhibition I $I \% = 100(A_0 - A_t) / A_0$	28

Liste des Figures

Liste des Figures

N°	Titre	Page
01	Morphologie des parties d' <i>Asphodelus microcarpus</i>	07
02	<i>Asphodelus microcarpus</i>	18
03	<i>Asphodelus tenuifolius</i>	18
04	Schéma récapitulative des étapes de traitements initiaux des échantillons	20
05	Étapes de préparation des échantillons.	21
06	Extraction des métabolites secondaires par l'extracteur de soxhlet.	24
07	Schéma récapitulatif de tout la partie expérimental	33
08	Rendement d'extraction de la partie sous terraine et aérienne d' <i>Asphodelus microcarpus</i> .	35
9	Rendement d'extraction de la partie sous terraine et aérienne d' <i>Asphodelus tenuifolius</i>	35
10	Rendement d'extraction des deux plantes étudiées <i>Asphodelus microcarpus</i> et <i>Asphodelus tenuifolius</i> .	36
11	La courbe d'étalonnage réalisée avec l'étalon acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux	44
12	Teneurs en polyphénols totaux dans les extraits l' <i>Asphodelus microcarpus</i> .	45
13	Teneurs en polyphénols totaux dans les extraits d' <i>Asphodelus tenuifolius</i>	46
14	Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.	47
15	Teneurs en Flavonoïde dans les extraits d' <i>Asphodelus microcarpus</i> étudiés.	47
16	Teneurs en Flavonoïde dans les extraits d' <i>Asphodelus tenuifolius</i>	48
17	Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tannins.	49

Liste des Figures

18	teneurs en tanin dans les extraits de l' <i>Asphodelus microcarpus</i> étudiés.	49
19	Teneurs en tanin dans les extraits de l' <i>Asphodelus tenuifolius</i> étudiés.	50
20	Le pourcentage des flavonoïdes et des tanins dans les polyphénols totaux	52
21	Concentration en chlorophylle a, chlorophylle b et caroténoïdes dans les différents extraits d' <i>Asphodelus microcarpus</i>	53
22	Concentration en chlorophylle a, chlorophylle b et caroténoïdes des différents extraits d' <i>Asphodelus tenuifolius</i> .	54
23	Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait éthanolique	56
24	Activité anti-radicalaire des extraits d' <i>Asphodelus</i> et le BHT.	57
25	Résultats de l'activité anti-bactérienne des deux plantes étudié <i>Asphodelus microcarpus</i> et <i>Asphodelus tenuifolius</i>	59

Sommaire

Sommaire

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

Chapitre I: Synthèse bibliographique

I. Description des plantes étudiées

I.1. La famille des Liliaceae	3
I.2. Le genre <i>Asphodelus</i>	3
I.2.1. <i>Asphodelus microcarpus</i>	6
I.2.1. <i>Asphodelus tenuifolius</i>	7
I.3. Différence entre <i>Asphodelus microcarpus</i> et <i>Asphodelus tenuifolius</i>	8
I.4. Composition chimique d' <i>Asphodelus microcarpus</i> et d' <i>Asphodelus tenuifolius</i>	9
I.5. Propriétés pharmacologiques d' <i>Asphodelus</i>	11

II. Généralités sur les métabolites secondaires

II.1. Les composés phénoliques.....	13
II.2. Les alcaloïdes.....	15
II.3. Les quinones	15
II.4. Les terpénoïdes	15
II.5. Les saponines	15

Sommaire

III. Propriétés biologiques des métabolites secondaires

III.1. Activités biologiques	16
III.1.1. Activité antioxydante	16
III.1.2. Activité antibactérienne	16
III.1.3. Activité antifongique	16
III.1.4. Activité anti-inflammatoire.....	17

Chapitre II: Matériels et méthodes

II.1. Matière végétale	17
1.1. Origine géographique et période de récolte de plantes.....	18
1.2. Préparation des échantillons.....	18
II.2. Détermination du taux d'humidité et la matière sèche	21
II.3. Extraction	21
3.1. Extraction par soxhlet.....	21
3.2. Macération à froid	23
3.3. Taux d'extraction.....	24
II. 4. Tests photochimiques.....	24
II. 4.1. Dosages qualitatifs	24
II.4.2. Dosages quantitatives.....	25
II.5. Activités biologiques.....	28

Sommaire

II.5.1. Activités anti-oxydante	28
II.5.2. Activité anti-bactérienne.....	29
II. 6. Analyse statistique.....	32

Chapitre III: Résultats et interprétation

I.Détermination du Taux d'humidité du matériel végétal	34
---	-----------

II.Rendement d'extraction	34
--	-----------

III. Tests phytochimiques

III.1. Dosage qualitatifs	36
---------------------------------	----

III.2. Dosage quantitatif.....	44
--------------------------------	----

III.2.1. Dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins	44
---	----

III.2.1.1.les phénols totaux	44
------------------------------------	----

III.2.1.2.Les flavonoïdes.....	46
--------------------------------	----

III.2.1.3. Les tannins	49
------------------------------	----

III.2.2. Dosage de la chlorophylle <i>a</i> , <i>b</i> , et caroténoïdes	52
--	----

IV. Activités biologiques

IV.1. Activité antioxydant	55
----------------------------------	----

IV.2. Activité anti-bactérienne	58
---------------------------------------	----

Conclusion	60
-------------------------	-----------

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Les plantes sont une source immense de molécules chimiques complexes exploitées par l'homme dans plusieurs industries telles que l'industrie cosmétique, l'industrie agro-alimentaire et l'industrie pharmaceutique. La diversité de ces molécules naturelles qui ne sont pas essentielles à la viabilité des plantes reste une énigme pour les biologistes qui essaient de décrypter leur rôle dans la nature. De même, l'élucidation des voies de biosynthèse conduisant à des produits naturels originaux est un champ d'investigation inépuisable pour les scientifiques. L'homme préhistorique, qui avait très peu de moyens, devait se nourrir des produits de cueillette et de chasse. En assimilant la flore locale, il a découvert les plantes utiles et indispensables pour survivre. Ce régime, essentiellement végétarien, a constitué le berceau de l'utilisation des produits naturels (**Barnham et al., 2004**).

L'Algérie est une région dotée d'une biodiversité très importante, avec une avalanche de plantes aromatique et médicinale. L'utilisation de ces plantes à des fins thérapeutiques est fréquente surtout dans les zones rurales.

Les effets protecteurs de ces plantes contre diverses maladies ont été attribués à la présence de composés phytochimiques (**Barejo et al., 2003**). Donc pour mieux expliquer d'où provient l'effet thérapeutique d'une plante, il faut procéder à une étude phytochimique des plantes suivie par une étude biologique. De ce fait, on a proposé d'étudier la composition phytochimique et l'activité biologique de deux espèces de plante du genre asphodèle : *Asphodelus microcarpus* et *Asphodelus tenuifolius* utilisée en pharmacopée traditionnelle pour traiter les fièvres, les indigestions, les constipations et des lésions cutanées.

Les plantes de genres asphodèle sont utilisées à l'Ouest d'Algérie et au Maroc contre toutes les formes d'abcès et contre les rhumatismes (Baba Aissa, 1991).

Dans notre pays l'Algérie, les racines fraîches de l'Asphodèle macérées dans de l'huile servent à traiter les otites, la poudre sèche de ces racines est utilisée en cataplasmes dans les douleurs des rhumatismes, la poudre sèche d'Asphodèle mélangée avec l'orge est conseillée comme diurétique (Ghaleb, 1987) et le suc de la racine de l'Asphodèle est utilisé dans le traitement des mycoses cutanées (Boukef, 1988 ; Ghaleb, 1987, ; Baba Aissa 1991) .

Introduction

Dans ce travail, on s'est intéressés à valoriser *Asphodelus microcarpus* et *Asphodelus tenuifolius* par la recherche des principaux groupes chimiques et le dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tannins, et par l'évaluation de l'activité antioxydante et anti-microbienne de leurs extraits.

Les objectifs de ce travail sont donc:

- Une contribution à une meilleure connaissance de la nature chimique d'*Asphodelus microcarpus* et *Asphodelus tenuifolius*.
- Une évaluation des activités antioxydants et antibactériennes des extraits d'*Asphodelus microcarpus* et *Asphodelus tenuifolius*.

Le présent manuscrit est organisé en trois chapitres. La première partie de ce travail concerne tout d'abord la synthèse bibliographique qui porte sur une description botanique et chimique des plantes du genre *Asphodeluse*.

La deuxième partie est consacrée aux matériel et méthodes où sont détaillés les protocoles expérimentaux relatifs à l'extraction, au dosage qualitatifs et quantitatif des composés phytochimiques, à l'évaluation des activités anti-oxydantes et antibactérienne des composés isolés. Puis la partie résultats et discussion qu'est consacrée pour la présentation et la discussion des différents résultats. Et conclusion générale ainsi que des perspectives de recherche sont apportées pour compléter le présent travail.

I. Description des plantes étudiées

I.1. La famille des Liliaceae

Les plantes de genre asphodèles appartiennent à la famille des Liliacées, qu'est l'une des plus grandes familles des angiospermes. Les espèces de cette famille botanique représentent 4,6% des plantes médicinales.

Cette famille englobe le plus souvent les plantes herbacées et vivaces monocotylédones, présentant généralement des organes de réserve (bulbes, cormes ou rhizomes), parfois succulentes. Leur distribution est cosmopolite, même si quelques groupes occupent des aires restreintes (**Philippe, 2013**).

Les limites de cette famille font l'objet de discussions sans fin, entre une approche large (280 genre et près de 5000 espèces) et une approche plus restrictive (5-10 genre et 350 espèces) (**Philippe, 2013**).

I.2. Le genre *Asphodelus*

L'asphodèle est une liliacée de très grande taille avec une tige qui peut atteindre facilement une hauteur d'un mètre cinquante. Ce genre pousse généralement autour du bassin méditerranéen et occupe surtout les sols calcaires.

Les asphodèles se sont des plantes annuelles ou bisannuelles caractérisées par (**BOUAZZA, 2001**):

- Des feuilles lancéolées ou toutes radicalaires, d'un beau vert brillant ;
- Des fleurs en grappes ou panicules, solitaires, avec une bractée scarieuse à la base et à pédoncule articulé. à six pétales (trois sépales et trois pétales absolument identiques) de quatre centimètres environ. Les pétales sont ornés d'une unique ligne longitudinale et les 06 étamines hypogynes et à filet dilaté à la base, dorsifixes, sont couronnées d'anthères orange ;
- Périanthe à tépales libres ou à peine connés à la base, uninerves ;
- Ovaire à 03 loges biovulées. Styles à stigmat trilobé ;
- Capsule loculicide, à valves ridées ou nerviées en travers ;

- Une tige drue, florifères nues de fort diamètre couronnée d'un énorme bouton marron bientôt strié de noir et de blanc. La taille nominale de cette tige est entre soixante-dix centimètres et un mètre cinquante.

Les principales espèces qui fait partie du genre asphodèle sont : *Asphodelus albus* (asphodèle blanc) , *Asphodelus arrondeaui* (asphodèle d'Arrondeau) ., *Asphodelus cerasiferus* (asphodèle-cerise), *Asphodelus fistulosus* (asphodèle fistuleux) , *Asphodelus ramosus* (asphodèle ramifié), *Asphodelus macrocarpus* , *Asphodelus microcarpus* et *Asphodelus tenuifolius* (*Asphodelus* à feuilles étroites) (**Philippe, 2013**).

Le tableau 1 récapitule les principales espèces rencontrées sur le territoire Algérien.

Tableau 1 : Les espèces d'asphodèles en Algérie.

Espèce	Synonymes	Nom arabe	Localisation
<i>Asphodelus acaulis</i>	<i>Clausiana acaulis</i>	Azzidda	Pâturages, clairières, fissures des rochers. Ain Mlila, Sétif. Assez commune : Sous secteur littoral algérois : près de Boghar. Sous secteur des sahels littoraux oranais. Sous secteur de l'Atlas tellien oranais.
<i>Asphodelus cerasiferus</i>	<i>Asphodelus repens</i> <i>Asphodelus corsicus</i>	Berouaga Ançal Belouaz	Forêts et pâturages de montagnes. Assez commune : Sous secteur de l'Atlas tellien oranais, monts de Tlemcen et de Daya.
<i>Asphodelus microcarpus</i>	<i>Asphodelus nervosus</i> <i>Asphodelus morisitanus</i>	Baton de saint joseph Berouaga Ançal Belouaz	Forêts et pâturages Très commune : Tell, hauts plateaux, Atlas saharien.
<i>Asphodelus refractus</i>	<i>Asphodelus pendulinus</i>	Acheub el Ibel Izéan, Tazia.	Pâturages sablonneux désertiques et subdésertiques. Assez commune dans la Sahara septentrional. Rare au Sahara central et méridional.
<i>Asphodelus fistulosus</i>		Bouzlima Boussila Belouaz Berouiga Zittout	Pâturages arides, steppes. Assez rare : sous secteur du littoral algérois. sous secteur des hauts plateaux algérois et oranais. sous secteur des hauts plateaux constantinois. sous secteur de l'Atlas saharien.
<i>Asphodelus tenuifolius</i>		Acheub el Ibel Izéan, Tazia.	Dunes, pâturages arides, steppes. Commune : Sous secteur des sahels littoraux oranais. Sous secteur des hauts plateaux. Tout le Sahara.

Dans notre mémoire on se propose d'étudier l'*Asphodelus microcarpus* et *Asphodelus tenuifolius*.

I.2.1. *Asphodelus microcarpus*

a. Systématique

La systématique d'*Asphodelus microcarpus* est la suivante (Zellagui, 1998) :

Règne	Végétal
Embranchement	Spermaphytes
Sous- embranchement	Angiospermes
Classe	Monocotylédones
Ordre	liliiflorae
Famille	liliaceae
Genre	<i>Asphodelus</i>
Espèce	<i>Asphodelus microcarpus</i>

b. Description botanique et structure morphologique

Asphodelus microcarpus est connu en Algérie sous différents noms vernaculaires: Barouag (dans l'est algérien), Balouaz (dans le centre algérien) et Ighri (chez le berbère). Cette plante à scape nettement marquée et plus ou moins élevée est caractérisée par :

- Des feuilles cylindriques ou semi-cylindriques (parfois planes sur la face interne seulement) et fistuleuses;
- Des fleurs blanches ou carnées (fig 1, b), de 15 mm de long maximum;
- Des tépales carénés, à carène verte ou pourpre;
- Des Capsule de 6-14 mm de long, oblongues, ovoïde ou subglobuleuse, à valves nettement ridées transversalement sur le sec (Fournier, 1947).

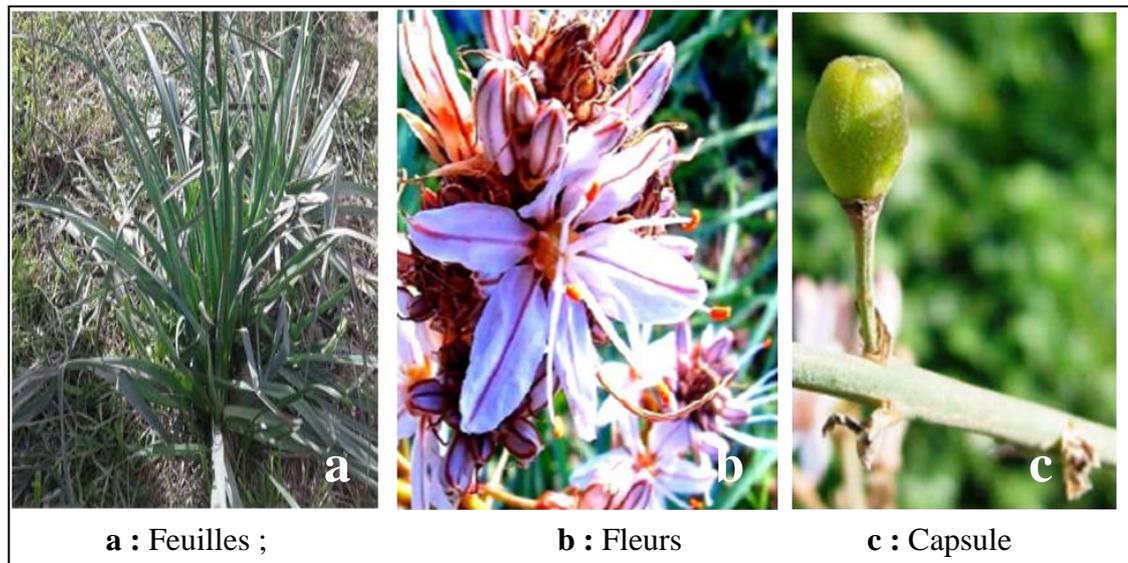


Figure 1: Morphologie des parties d'*Asphodelus microcarpus*

c . Répartition Géographique

La plante est endémique du bassin méditerranéen poussant sur les terrains pauvres moyennement arrosés, dans Garrigue, falaises, steppe, préfère région semi-aride ou le sol est peu profond comme les endroits rocheux. Dans les régions sableuses et rocailleuses des forêts du Nord de l'Afrique et les hauts plateaux, le Tell et l'atlas saharien de l'Algérie (Zellagui, 1998).

I.2.2. *Asphodelus tenuifolius*

a. Systématique

La systématique d'*Asphodelus tenuifolius* est la suivante (OZENDA, 2004) :

Règne	Végétal
Embranchement	Spermaphytes
Sous- embranchement	Angiospermes
Classe	Monocotylédones
Ordre	Asparagales
Famille	Liliaceae
Genre	<i>Asphodelus</i>
Espèce	<i>Asphodelus tenuifolius</i>

b. Description botanique et structure morphologique

Asphodelus tenuifolius est communément appelé en Algérie exactement à Beni mezab « Tazia » c'est une plante annuelle herbacée monocotylédone. Cette plante à scape nettement marquée et plus ou moins élevée est caractérisée par :

- Des feuilles cylindriques ou semi cylindriques (parfois planes mais sur la face interne seulement), et creuses partent toutes de la base ; fistuleuses. Feuilles scabres sur les nervures ;
- Des fleurs blanchâtres ou rosées, de 5 à 12 mm de long, à tépales libres;
- Des graines plissées sont à trois angles;
- Des pédoncules fructifères dressés, généralement articulés sous le milieu ou, parfois, un peu au dessus.
- Des inflorescences qui portent peu de fleurs ;
- Des fruits avec des capsules sphériques de 4 à 6 mm contenant des graines noires, plissées et triangulaires (OULD EL HADJ *et al.*, 2003).

c. Répartition Géographique

Asphodelus tenuifolius est une espèce assez commune dans tout le Sahara Algérien et dans les sous secteur des hauts plateaux (OZENDA, 2004). Cette plante est originaire d'Afrique du Nord, du Sud Ouest de l'Europe, de la péninsule arabique, de l'Asie du Sud, du Pakistan et de l'Inde (FREIJE *et al.*, 2013).

I.3. Différence entre *Asphodelus microcarpus* et *Asphodelus tenuifolius*

Le tableau ci-après récapitule les différences entre les deux plantes étudiées *Asphodelus microcarpus* et *Asphodelus tenuifolius*.

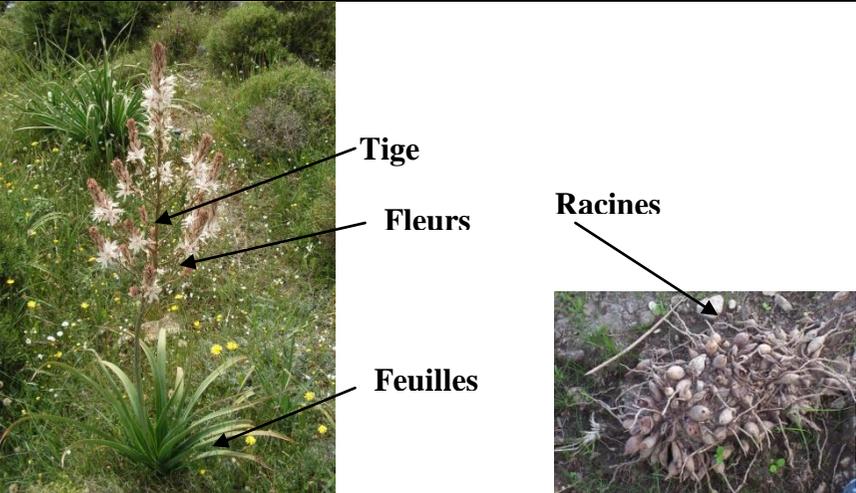
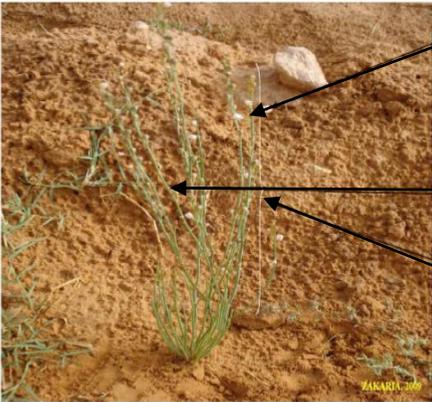
Tableau 2: Différence entre *Asphodelus microcarpus* et *Asphodelus tenuifolius*.

	<i>Asphodelus microcarpus</i>	<i>Asphodelus tenuifolius</i>
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Appareil végétatif • Forme biologique • Ramification • Feuille • Bourgeon 	<p>Eriger</p> <p>Unique, scape ramifié</p> <p>- Disposition : Rosette basale</p> <p>- Attachement : forme sessile et tige souterraine</p> <p>- Forme : d'épée, longue et plate devient pointu à la fin.</p> <p>- Nervures : nervures parallèles</p> <p>- Bord de la feuille : feuille entière à extrémité lisse</p> <p>- Couleur blanche avec des rayures brune rougeâtre verticales</p>	<p>Eriger</p> <p>Unique ramifié</p> <p>Cylindriques, creuses, très étroites</p> <p>Couleur vert vif prenant naissance à la base, avec les hampes courtes.</p>
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Appareil reproducteur • Fleur 	<p>- Couleur : blanche ou carnées</p> <p>- Parfum : agréable, doux</p> <p>- Taille : 35 mm</p> <p>- Nombre de pétale :6</p>	<p>- Couleur : blanche ou rosées, à pédoncule non recourbé après la floraison</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Inflorescence 	panicule	portent peu de fleurs
<ul style="list-style-type: none"> • Fruits 	-Capsules vertes de forme ovoïde	-Forment des capsules qui contiennent de minuscules graines noires.

I.4. Composition chimique d'*Asphodelus microcarpus* et d'*Asphodelus tenuifolius*.

La composition chimique d'*Asphodelus microcarpus* et d'*Asphodelus tenuifolius* est récapitulée dans le tableau suivant.

Tableau 3 : Quelques données chimiques sur d'*Asphodelus microcarpus* et d'*Asphodelus tenuifolius*.

Espèce	Organes étudiés	Molécules extraites	Références
<i>Asphodelus microcarpus</i>	 <p>Partie aérienne</p> <p>Partie terrestre</p>	1.8 dihydroxyanthraquinone Bichrysophanol Aloe-emodin Chrysophanol Chrysophanol glycoside	A. M. RIZK, 1971
<i>Asphodelus tenuifolius</i>	 <p>Partie aérienne</p>	Aloe-emodin Chrysophanol Chrysophanol glycoside	A.M. RIZK,1971.

I.5. Propriétés pharmacologiques d'*Asphodelus*

I.5.1. Utilisations comestibles

Les racines (tubercules), les graines et les tiges ont été consommés dans le passé. Le tubercule peut être mangé cuit. Car il est riche en amidon, séchés et cuits à l'eau il devient mucilagineuse et peut être mélangé avec les grains pour faire du pain nutritif.

L'ébullition détruit le principal âcre dans les tubercules, et les rendant très agréable à manger la hampe florale (tige qui porte les fleurs) peut également être cuite et mangée. Hésiode, poète grec (8ème siècle A.J.C), décrit asphodèle comme l'ingrédient de base de la pâte d'un pauvre homme : " imbéciles qu'ils ne savent pas le grand bienfait de l'asphodèle ". Hippocrate et Dioscoride disaient que les racines ont été mangées rôties dans la cendre. Théophraste a raconté que la racine a été haché en purée avec les figues et le tout a été consommé. Le byzantine (5ème siècle de notre ère) lexicographe Hésychius d'Alexandrie (Hesychius d'Alexandrie), a également déclaré que la racine de l'asphodèle est comestible. Les feuilles également ont été utilisées pour la production d'un type spéciale du fromage italien Rignano garganico (**Fournier ,1947**).

I.5.2. Rôle et usage traditionnels :

Elle été utilisé pour traiter plusieurs maladies par les grecques et les latins mais elle n'est pas très utilisé dans la médecine actuellement. Et elle est utilisé pour soulager ou prévenir les spasmes (surtout pour le muscle lisse), et tend à augmenter le flux de l'urine et favorise l'écoulement menstruel chez les femmes.

Une autre utilisation traditionnelle qui n'est plus utilisé actuellement est celle de la dermatite et les brûleurs du soleil (**Ruiz *et al.*, 1990**).

I.5.3. Intérêt thérapeutique

L'Asphodèle est une plante importante dans la pharmacopée traditionnelle (**Fournier, 1948**). La plante est utilisée en tisane, en poudre, ou en pommade pour les traitements des fièvres, des indigestions, des constipations et des lésions cutanées.

En Maroc la décoction des racines est utilisée contre toutes les formes D'abcès et la décoction de feuilles en cataplasmes contre les rhumatismes (**Baba Aissa, 1991**).

En Inde (**Kotb, 1983**), l'Asphodèle est utilisé pour traiter l'ulcère gastrique chez l'homme en lui faisant absorber la poudre de la plante séchée dans un verre de lait.

La poudre issue des graines d'*Asphodelus tenuifolius* s'utilise par les populations de Thari (Nara Désert, Pakistan) contre les hémorroïdes

En Algérie, les racines fraîches de l'Asphodèle macérées dans de l'huile servent à traiter les otites. La poudre sèche de ces racines est utilisée en cataplasmes dans les douleurs des rhumatismes. En mélange avec l'orge, la poudre d'Asphodèle est conseillée comme diurétique (**Ghileb 1987**) Quand à la propriété curative la plus certaine et confirmée par de nombreux travaux (**Boukef ,1986 ; Ghileb, 1987 ; Baba Aissa 1991**) est l'utilisation du suc de la racine de l'Asphodèle dans le traitement des mycoses cutanées.

II. Généralités sur les métabolites secondaires

Les plantes possèdent des métabolites dits « secondaires » par opposition aux métabolites primaires que sont les protéines, les glucides et les lipides. On appelle métabolites secondaires des composés bio synthétisés naturellement ces composés possèdent des propriétés thérapeutiques et sont utilisés en médecine traditionnelle et moderne (Nguyen *et al.*, 2013).

On distingue classiquement plusieurs catégories de métabolites secondaires en fonction de leur nature biochimique et de leur origine biosynthétique : les composés phénoliques (tanins, quinones, flavonoïdes), les alcaloïdes, les quinones, les tritérpanoïdes et les saponines (Priva et Aparna, 2012).

II.1. les composés phénoliques

Durant ces dernières années, plusieurs chercheurs se sont intéressés aux composants phénoliques à cause de leur pouvoir à piéger les radicaux libres et les bienfaits potentiels de leur consommation sur la santé humaine (Manach *et al.*, 2004).

II.1.1. Définition des composés phénoliques

Les composés phénoliques regroupent un vaste ensemble de plus de 8 000 molécules, divisées en une dizaine de classes chimiques, qui présentent tous un point en commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles OH (Hennebelle *et al.*, 2004).

Les composés phénoliques diffèrent dans leur structure selon le nombre et la position des hydroxylations et méthylations du cycle aromatique. On les retrouve dans de nombreux fruits, légumes, le café, les prunes, les myrtilles, le raisin et les pommes (Bourgou *et al.*, 2008).

II.1.2. Classification des composés phénoliques

Les polyphénols sont divisés en plusieurs classe chimiques selon différents critères, plusieurs classifications on été proposées :

- Lopéz *et al.*, ont classé les polyphénols selon le nombre de carbone en dix groupes (phénols simples , acide phénoliques, acide phénylacétique, acide

cénamique..., Naphtoquinones, Xanthonnes, Stilbènes, Flavonoïdes, Lignines, Biflavonoides).

- Ribero-Gayou (1986) à classé les polyphones selon leurs répartition dans le monde végétale en trois groupes : les composés les plus répandus (flavonoïdes), les composés peu répandus (biflavanoles), les composés complexes (tanins).
- Hennebelle et al., 2004 ont classé les polyphones selon en trois groupes selon la couleur : les composés incolores (tanins), les composés jaunes orangés (les flavonoïdes) , les composés jaunes violet (les anthocyanes).
- Fine (2000) ; Sarni-Manchado et Chynier (2006) classe les polyphénols ont se basant sur leurs squelette en deux groupes : les composés phénoliques simples et les composés complexe (Forme condensés).

II.1.2.1. Les composés phénoliques simples

a. Acides phénoliques

Ce sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un Hydroxyle phénolique. Ils sont représentés par deux sous-classes :

Les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque et de l'acide hydroxycinnamique (**Thompson *et al.*, 1984**).

b. Flavonoïdes

Présentes dans la plupart des plantes, les flavonoïdes sont des pigments polyphénoliques qui sont responsable dans la plupart des colorations des fleurs et des fruits. Ils possèdent de nombreuses vertus thérapeutiques. Ils sont particulièrement actifs dans le maintien d'une bonne circulation. Certains ont aussi des propriétés anti-inflammatoires et anti virales, d'autres ont des effets protecteurs sur le foie (**Igor, 2002**).

II.1.2.2. Polyphénols complexes (tanins)

Les tanins sont un groupe diversifié de métabolites secondaires des plantes qui ont deux caractéristiques communes : tous sont des polyphénols et tous ont la capacité de fixer les protéines. Cependant, l'étude des effets nutritionnels des tanins est complexe parce que les plantes contiennent une grande diversité de tanins.

Certains tanins produisent des effets toxiques tandis que d'autres bénéficient de la santé et de la nutrition (**Harvey, 2006**).

II.2. Les alcaloïdes

Sont des substances organiques d'origine végétale, azotées et à caractère alcalin. Bien que beaucoup d'entre eux soient toxiques (comme la strychnine ou l'aconitine), ils représentent les principes actifs de nombreuses plantes médicinales. Ils ont joué un rôle important dans la découverte des médicaments (morphines, quinine cocaïne, atropine...) et dans le développement de l'industrie pharmaceutique (**Omulokoli et al, 1997**).

L'étude de leur mécanisme d'action a conduit à les employer comme réactifs biologiques en neurochimie et en chimiothérapie. Ils sont dotés aussi d'un pouvoir antioxydant (**Roué, 2011**).

II.3. Quinones

Les quinones sont des composés intéressants qui ont des caractéristiques uniques et plusieurs rôles importants. Ils sont largement distribués dans la nature, y compris dans les tissus animale et végétale. Ils ont un rôle important dans la chaîne de transport d'électrons pour maintenir les fonctions biologiques des plantes et des animaux. En plus de ces rôles biologiques, les quinones ont été utilisées dans une grande variété de pratique clinique (**Girre et al ., 2006**).

II.4. Les terpénoïdes

Ils représentent le groupe le plus diversifié des métabolites secondaires des végétaux, plus de 15.000 composés différents sont décrits dans la littérature. Ils dérivent d'une structure de base à cinq carbones (C_5H_8), communément appelée isoprène selon le nombre répétitif de cette unité, les terpénoïdes sont classés en : monoterpénoïdes (C10), sesquiterpénoïdes (C15) et diterpénoïdes (C20) (**Anderson et al., 2006**).

II.5. Les saponines

Principaux constituants de nombreuses plantes médicinales, les saponines doivent leur nom au fait que, comme le savon, elles produisent de la mousse quand on les plonge dans l'eau. Les saponines existent sous deux formes, les stéroïdes et les triterpénoïdes (**Cavina et al ., 1999**).

III. Propriétés biologiques des métabolites secondaires

III.1. Activités biologiques

Les métabolites secondaires responsables de multiples activités biologiques et thérapeutiques, des études antérieures ont prouvé l'implication de ces composés phénolique dans plusieurs activités biologiques telles que l'activité antioxydant, l'activité antibactérienne l'activité anticancéreuse et l'activité enzymatique.

III.1.1. Activité antioxydante

Un antioxydant est défini comme étant toute substance qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substrats biologiques. Les antioxydants sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs, la raison pour laquelle les antioxydants sont importants vient du fait que l'oxygène est un élément potentiellement toxique puisqu'il peut être transformé en formes plus réactives telles que le superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'oxygène singulier (O) et les radicaux hydroxyles (HO), collectivement connu sous le nom d'oxygène actif (**Bozin et al., 2008**).

III.1.2. Activité antibactérienne

Les plantes n'ont pas un système immunitaire proprement dit qui peut identifier une infection spécifique, leurs propriétés antimicrobiennes sont généralement efficaces contre une large gamme de micro-organisme. Ces propriétés sont utiles pour les infections chez les humains (**Remmal et al., 1993**).

III.1.3. Activité antifongique

Le pouvoir antifongique des plantes aromatiques a été mis en évidence par de nombreux auteurs contre les moisissures allergisantes et contre les dermatophytes et les champignons pathogènes et opportunistes tels que *Candida albicans* (levure) (**Billerbeck et al., 2002**)

III.1.4. Activité anti-inflammatoire

Les plantes à activité anti-inflammatoire, sont des espèces ayant une action sur plusieurs facteurs de l'immunité extra et intracellulaire comme ceux du complément et, sont le plus souvent des plantes contenant des polysaccharides spécifiques ayant une activité immunomodulatrice. Les polysaccharides sont les constituants immunostimulants les plus efficaces (GOETZ, 2004). Les espèces *Astragalus armatus*, *Plantago notata*, *Asphodelus tenuifolius*, et *Urginea noctiflora* ont retenu l'attention en premier lieu pour leur utilisation traditionnelle à Ghardaïa comme anti-inflammatoire et, en second lieu, en raison du peu de travaux d'activités biologiques répertoriés sur ces quatre espèces végétales.

II. Matériels et méthodes

II.1. Matière végétale

Dans notre travail on a étudié deux plantes de genre Asphodèle à savoir *Asphodelus microcarpus* (**Fig.2**) et *Asphodelus tenuifolius* (**Fig.3**). Ce sont les feuilles et les tiges (partie aérienne) les tiges (partie aérienne) ainsi que les racines (partie sous terraine) de ces plantes qui font l'objet de ce travail.

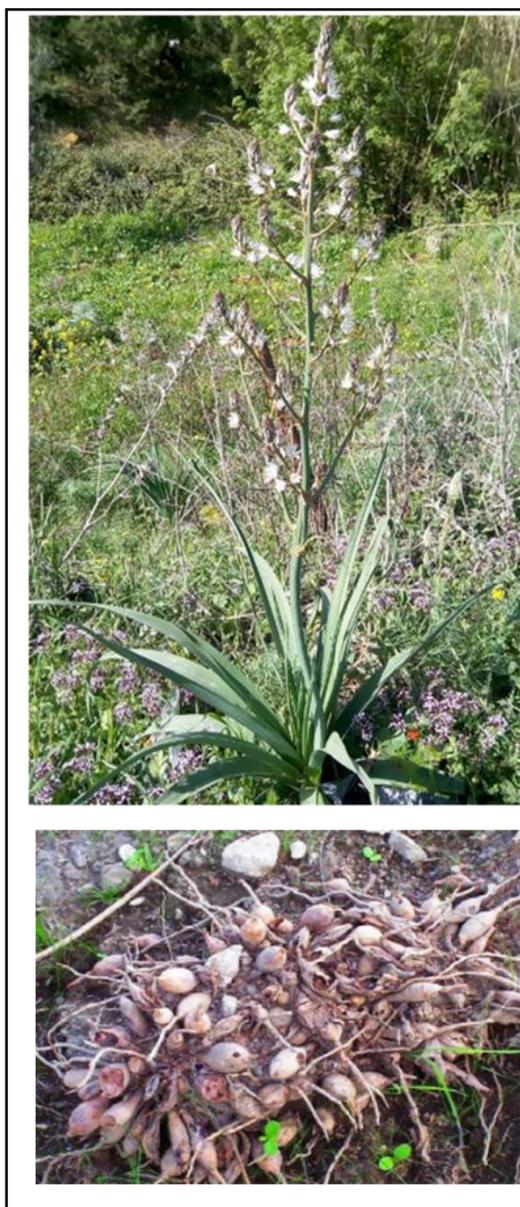


Figure 02: *Asphodelus microcarpus*



Figure 03: *Asphodelus tenuifolius*

II.1.1. Origine géographique et période de récolte des plantes

Les échantillons d'*Asphodelus microcarpus* ont été récoltés dans la période de floraison durant le mois de Mars 2017 dans la région de wellad gueffiffa à 5 kilomètres de la Wilaya de BOUIRA.

Les échantillons d'*Asphodelus tenuifolius* ont été récoltés durant le mois d'avril dans le Sahara Algérien (région de chaabna de Ghardaia).

La récolte des échantillons a été effectuée le matin pour éviter les effets de la chaleur.

II.1.2. Préparation des échantillons

Les plantes étudiées subissent plusieurs étapes de traitements initiaux en vue d'obtenir les extraits sur lesquels notre recherche sera réalisée.

Les opérations essentielles impliquées dans le traitement sont récapitulées dans le schéma suivant (**Fig.4 et Fig.5**):

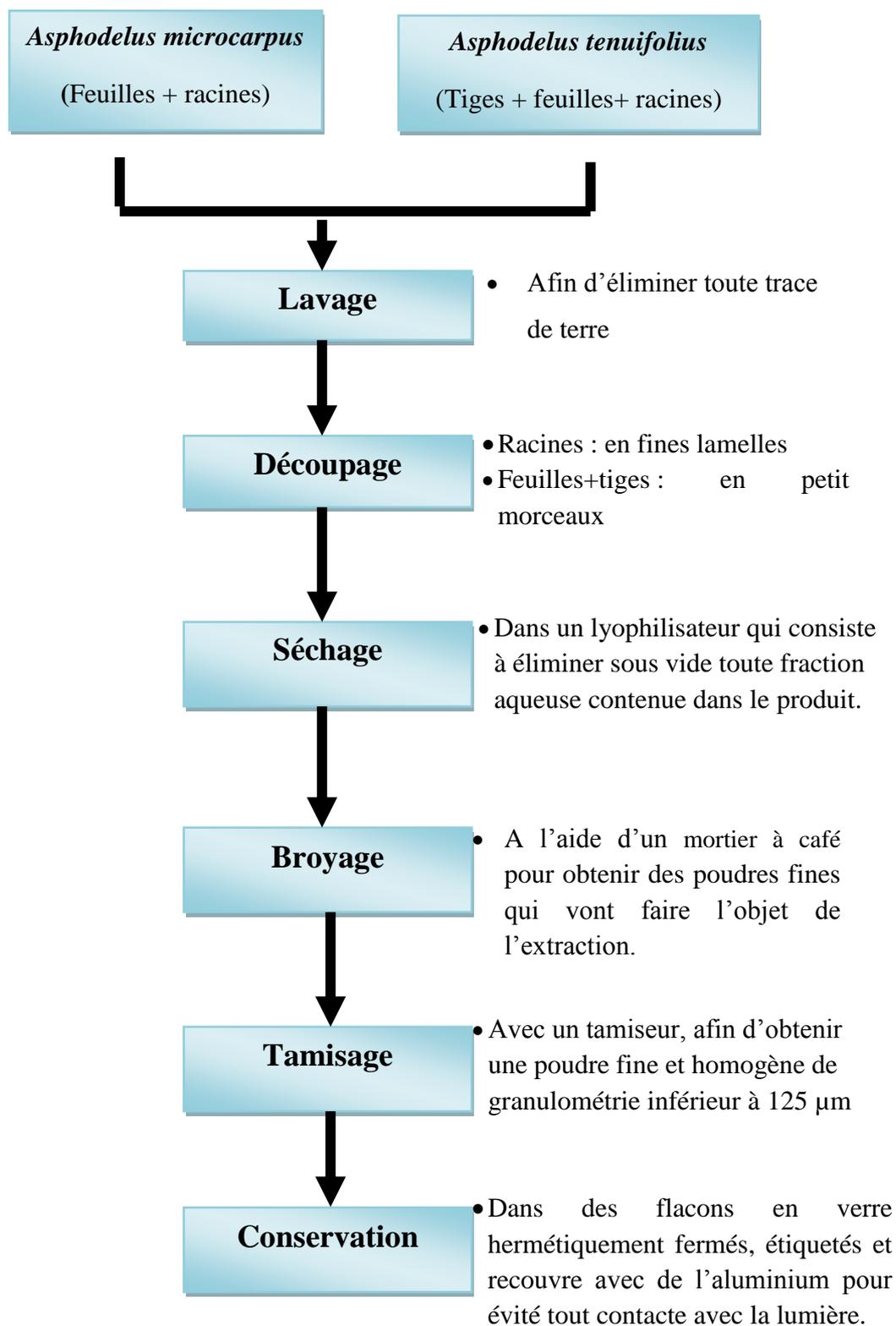


Figure 04 : Schéma récapitulatif des étapes de traitements initiaux des échantillons

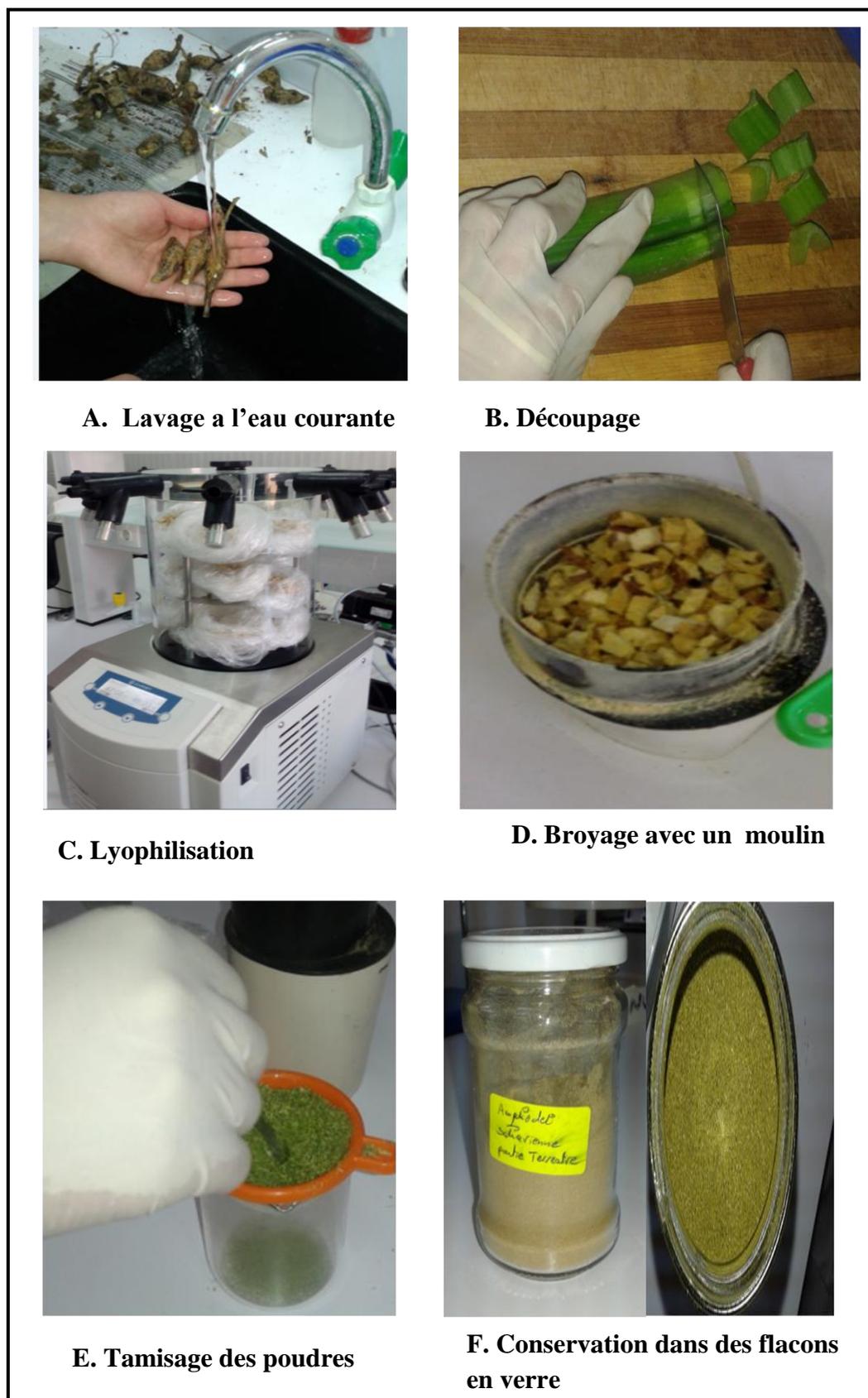


Figure 5: Étapes de préparation des échantillons.

II.2. Détermination du taux d'humidité et la matière sèche

Le taux d'humidité est la quantité d'eau contenue dans le végétal frais. Le principe de la détermination de l'humidité consiste à prendre une masse m_1 de l'échantillon et l'apporter à une température de 103°C à l'étuve jusqu'à ce que la masse devienne constante (m_2) (Barros *et al.*, 2010).

Le taux d'humidité (H%) est calculé selon la formule suivante:

$$H\% = ((m_1 - m_2)/m_1) \times 100 \dots\dots\dots (1).$$

D'où :

H% : Taux d'humidité en pourcentage;

m_1 : Masse de l'échantillon avant séchage;

m_2 : Masse de l'échantillon après séchage.

II.3. Extraction des métabolites secondaires

L'extraction est une étape qui permet la transformation de la matière végétale en un extrait. Le choix du solvant d'extraction est un facteur déterminant dans la procédure d'extraction. Ce choix dépend de la nature des composés recherchés.

Dans le présent travail, l'extraction a été réalisée par deux méthodes décrites par (Raaman, 2006). Ces méthodes sont : une extraction par soxhlet et une macération à froid.

Dans notre étude l'extraction a été réalisée en utilisant les solvants suivants : eau/méthanol (30:70) (v/v) et eau/éthanol (30:70) (v/v) et eau bi- distillée.

II.3.1. Extraction par soxhlet

- **Principe**

L'extraction par Soxhlet est une méthode simple et convenable permettant de répéter infiniment le cycle d'extraction avec du solvant frais jusqu'à l'épuisement complet du soluté dans la matière première (william, 2007).

- **Mode opératoire**

Une quantité de poudre lyophilisée (20g) de chaque plante étudiée a été placée dans une cartouche de cellulose (une matière Pénétrable pour le solvant), celle-ci est placée à son tour dans l'extracteur de l'appareil de Soxhlet . Ce dernier est monté sur un ballon chauffé à 60°C , contenant 250 ml de solvant d'extraction.

Dans notre étude l'extraction par soxhlet a été réalisée en utilisant les solvants suivants : eau/méthanol (30:70) (v/v) et eau/éthanol (30:70) (v/v).

Au dessus duquel est placé un réfrigérant servant à liquéfier les vapeurs du solvant.

Le ballon étant chauffé, le liquide est amené à ébullition, les vapeurs du solvant passent par le tube de distillation et rentrent dans le réfrigérant pour être liquéfiées. Ensuite, le condensat retombe dans le corps de l'extracteur sur la cartouche, faisant ainsi macérer le solide dans le solvant. Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'au niveau du sommet du tube-siphon, suivi par le retour dans le ballon du liquide de l'extracteur accompagné de substances extraites. Ainsi le solvant dans le ballon s'enrichit progressivement en composants solubles. L'extraction continue jusqu'à l'épuisement de la matière solide chargée dans la cartouche.

L'extrait obtenu est filtré à l'aide de papier filtre de 20 µm de diamètre et conservé dans des flacons en verre opaque à une température de 4°C.

A l'issue de cette opération, l'extrait brut est évaporé en utilisant un rotavapeur de type STUART.

Le schéma d'extraction par un appareil Soxhlet est représenté sur la figure 6

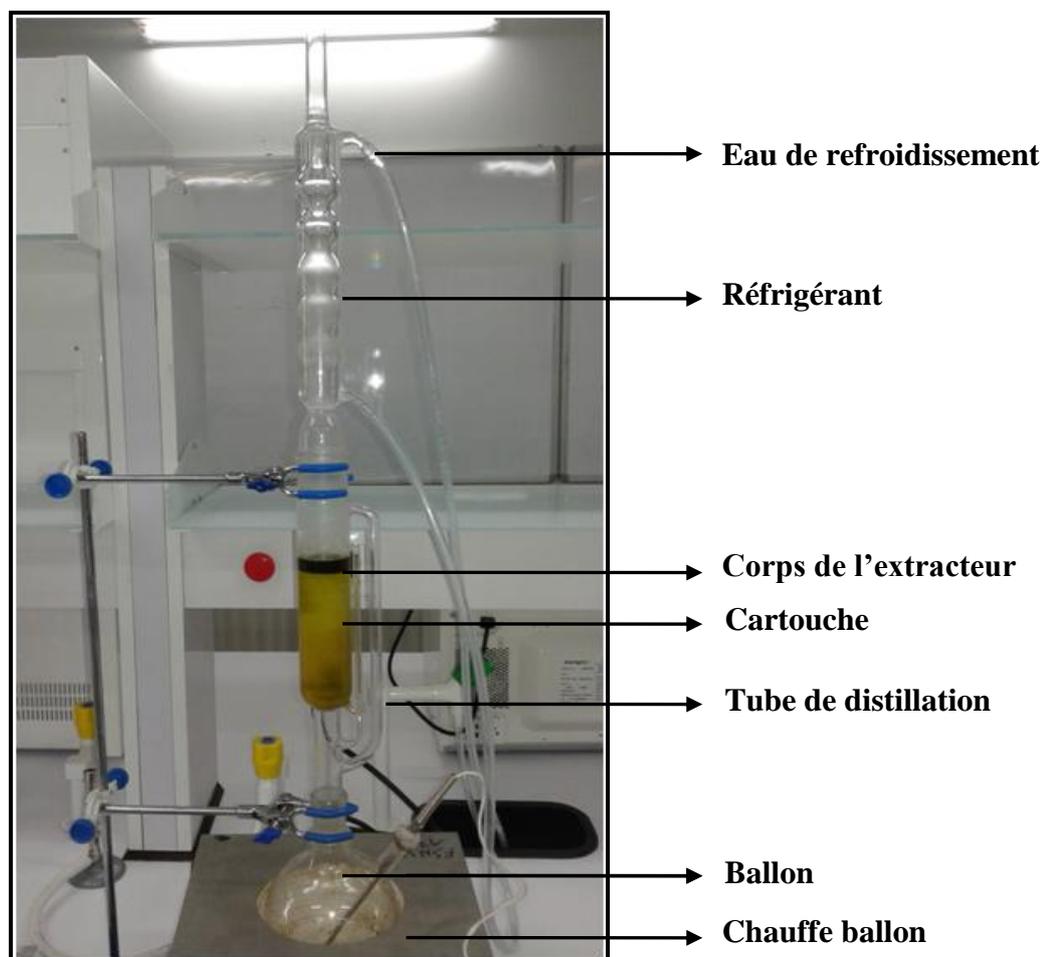


Figure 06: Extraction des métabolites secondaires par l'extracteur de soxhlet.

II.3.2. Macération à froid

- **Macération**

Une quantité de 5g de poudre végétale sont ajustés avec 100 ml de solvants organiques: eau/méthanol (30:70) (v/v), eau/éthanol (30:70) (v/v), eau bi-distillée (extrait aqueux).

Pour maintenir les particules en suspension, les solutions sont soumises à une agitation pendant 24h à la température ambiante et à l'abri de la lumière.

Après 24 h de macération, les solutions ont été filtré sur un papier filtre. Les filtrats récupérés sont en suite évaporés pendant 2h à 35 °C, à l'aide d'un rota vapeur de type STUART.

Les extraits secs sont reconstitué dans l'eau bi-distillée, lyophilisés, et conservés à 4°C.

II.3.3. Taux d'extraction

Selon (Falleh *et al.*, 2008) le taux d'extraction (rendement) est calculé comme suit :

$$R\% = \frac{M_{\text{ext}}}{M_{\text{éch}}} \times 100 \dots\dots\dots (2).$$

Avec :

R% : Taux d'extraction ;

M ext : La masse de l'extrait après évaporation du solvant en mg;

M éch : La masse sèche de l'échantillon végétal en mg.

II. 4. Tests phytochimiques

II. 4.1. Dosages qualitatifs

Le dosage qualitatif permet de mettre en évidence les différentes familles chimiques présentes dans les extraits *Asphodelus microcarpus* et *Asphodelus tenuifolius* par plusieurs réactions de coloration et de précipitation.

II.4.1.1. Les composés phénoliques simple (Flavonoïdes)

La présence des flavonoïdes est indiquée par la formation d'un complexe jaunâtre (Iqbal, 2011). De ce fait, 1ml de chaque extrait est ajouté à 100 µl de chlorure d'aluminium à 3% et quelques copeaux de magnésium.

II.4.1.2. Les composés phénoliques complexes : Tanins

Dans un tube à essai contenant 1ml d'extrait on a ajouté 200 µl d'une solution aqueuse diluée de FeCl₃ à 1%. En présence des tanins, il se développe une coloration verdâtre ou bleu noirâtre (Karumi *et al.*, 2004).

II.4.1.3. Les quinones libres

Sur un volume de chacun de nos extraits, on a ajouté quelques gouttes de NaOH 1%. L'apparition d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones libres (Oloyde, 2005).

II.4.1.4. Les terpénoïde: Test de Slakowski

Pour caractériser les terpénoïde, on a ajouté à 5 ml de l'extrait, 2 ml de chloroforme et 3 ml d'acide sulfurique concentré. La formation d'un anneau marron- rouge à l'interphase indique la présence des terpénoïdes (**Khan et al., 2011**).

II.4.1.5. Les saponosides

La caractérisation des saponosides est réalisée selon le protocole décrit par N'Guessan *et al*, 2009. Cette caractérisation consiste à agiter 10 ml de l'extrait pendant 15 secondes à raison de deux agitations par seconde, puis à mesurer la hauteur de mousse formé après 15 min de repos (**N'Guessan et al., 2009**).

Pour obtenir la mousse une série des dilutions est préparée (10% ,20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%) en introduisant dans 10 tubes à essai 1 ml à 10 ml d'extrait de chaque plante et on complète à 10 ml avec de l'eau bi-distillée. Une hauteur de mousse persistante et supérieur à 1 cm indique la présence de saponosides.

L'indice de mousse (Im) se calcule à partir du numéro du tube (N) dans lequel la hauteur de la mousse est de 1 cm.

L'indice de mousse (IM) est calculé par la formule suivante :

$$IM = 1000/N \dots \dots \dots (3)$$

N : nombre de tube dans lequel la hauteur de mousse est égale ou supérieur à 1cm.

II.4.2. Dosages quantitatifs

4.2.1. Dosage des phénols totaux

La teneur des composés phénoliques à été déterminée selon le protocole décrit par (**Singleton et Rossi, 1965**). A un volume de 500 µl d'extrait a été additionné de 2.5 ml de réactif de Folin-ciocalteu dilué à (1/10). Après 2 minutes d'incubation à l'obscurité, 2 ml de carbonate de sodium (75%) sont ajoutés. L'absorbance a été mesurée au spectrophotomètre de type XP 3000 à 760 nm après 15 min

d'incubation au bain marie à 50°C et refroidissement direct dans un bain de glace, le dosage est effectué en triple.

La concentration en composés polyphénols totaux a été déterminée à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage réalisée avec le standard étalon d'acide gallique. Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme de poudre sèche (mg EAG/g de MS).

4.2.2. Dosage des tanins

Un volume de 1ml de l'extrait a été additionné à 5ml d'une solution qui se compose de deux volumes de vanilline à 4% (préparé dans le méthanol) avec un volume de HCL à 37 %. L'absorbance a été mesurée au spectrophotomètre à 500 nm après 20 min d'incubation à l'obscurité (**Iqbal, 2011**).

La teneur en tanins a été déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée avec la catéchine. Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent catéchine par gramme de la matière sèche (mg EC/g de MS).

4.2.3. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes totaux à été déterminée par la méthode d' AlCl_3 de (**Lamaison et carnet, 1990**). 100 μl de chaque extrait est mélangé avec 1ml de la solution méthanolique de AlCl_3 (0.1 M). Après, 10 min d'incubation à l'obscurité, la lecture est faite à 430 nm contre un blanc préparé sans extrait.

La teneur en tanins à été déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée avec la quercitrine. Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent quercitrine par gramme de la matière sèche (mg EQ/g de MS).

4.2.4. Dosage des chlorophylles a, b et caroténoïdes

Le dosage des chlorophylles a, b et caroténoïdes est basée sur la mesure des absorbances à différentes longueurs d'ondes des extraits dilués à (1/10) : 664 nm pour la chlorophylle a ; 648 nm concernant la chlorophylle b et 470 nm pour les caroténoïdes. Selon (**Lichtenthaler, 1982**) les concentrations de la chlorophylle a, chlorophylle b et des caroténoïdes dans les extraits ont été calculées selon les formules suivantes :

$$C_a (\mu\text{g/ml}) = 13,36A_{664,1} - 5,19A_{648,6} \dots \dots (4)$$

$$C_b (\mu\text{g/ml}) = 27,43A_{648,6} - 8,12A_{664,1} \dots \dots (5)$$

$$C_{X+C} (\mu\text{g/ml}) = (1000A_{470} - 2,13 C_a - 97,64C_b)/209 \dots \dots (6)$$

II.5. Activités biologiques

II.5.1. Activités anti-oxydante

L'activité antioxydante des deux plantes *Asphodelus microcarpus* et *Asphodelus tenuifolius* à été évalué sur l'extrait qui présente le rendement le plus élevé et la quantité la plus élevée en poly phénols totaux.

Les méthodes les plus employés pour évaluer l'activité anti-oxydante des extraits des plantes sont celles impliquant des composés chromogènes de nature radicalaire. La présence des anti-oxydants dans les extraits des plantes conduit à la disparition de ces radicaux. Les deux radicaux les plus utilisés sont les radicaux ABTS et DPPH (Adhikari *et al.*, 2007, Blanc *et al.*, 2011).

Dans notre travail, l'activité antioxydante des extraits d'*Asphodelus* à été évaluée *in vitro* par la méthode de piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl), qui se caractérise par sa capacité de former des radicaux libres stables. La présence de ces radicaux DPPH donne lieu à une coloration violette foncée de la solution, qui absorbe aux environs de 517 nm. La réduction des radicaux DPPH par un agent antioxydant entraîne une décoloration de la solution qui devient jaune pâle et une diminution de l'absorbance (Coelho *et al.*, 2011).

Pour chaque extrait, des dilutions ont été préparées dans de méthanol (100 mg/l à 800 mg/l). 25 μl des extraits à différentes concentrations est ajouté à 975 μl d'une solution de DPPH (10^{-3} M). Après incubation à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 30 min, l'absorbance est mesurée à 517 nm (Atoui *et al.*, 2005).

Le pourcentage d'inhibition I est calculé selon la formule suivante :

$$I \% = 100(A_0 - A_t) / A_0 \dots \dots \dots (7)$$

Avec :

I % : Pourcentage d'inhibition ;

A₀ : Absorbance du contrôle (DPPH à 10^{-3} M) ;

A_t : Absorbance de l'extrait.

II.5.2. Activité anti-bactérienne

L'activité anti-bactérienne des deux plantes *Asphodelus microcarpus* et *Asphodelus tenuifolius* à été évalué sur l'extrait qui présente le rendement le plus élevé et la quantité la plus élevée en poly phénols totaux.

Pour la mise en évidence de l'activité antibactérienne, deux souches bactériennes ont été testées vis-à-vis de nos extraits, à savoir *Staphylococcus aureus* (bactérie Gram Positif) et *Escherchia Coli* (bactérie Gram Négatif). Ces bactéries différent l'une de l'autre par leurs structure cellulaire et leur métabolisme particulier (**Tab.4**). Les souches bactériennes utilisées proviennent de l'Institut Pasteur d'Alger.

Tableau 4 : Différence entre les deux bactéries.

<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherchia Coli</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Ce sont des cocci à Gram positif • De forme sphérique qui tendent à se grouper en amas irréguliers ou réguliers à la façon d'une grappe de raisin (Nauciel, 2000). • Des germes aérobie- anaérobie facultatif (Nauciel, 2000). • Ce sont une composante essentielle de la flore humaine normale, mais comprennent aussi des espèces qui sont d'importants pathogènes. • Ce sont des germes ubiquistes largement distribués dans l'environnement naturel de l'homme. • L'espèce est responsable de plusieurs infections (osseuses, digestives, pyogène de la peau et des muqueuses...) (Tony et Paul, 1997). 	<ul style="list-style-type: none"> • Bactérie à Gram Négatif • Ce genre appartient à la famille des entérobacteriaceae, qui sont des hôtes du tube digestif de l'homme et des animaux (nombreuses souches de cette famille ont été isolées de l'environnement aquatique ou terrestre). • C'est l'espèce dominante de la flore aérobie du tube digestif (Nauciel, 2000). • Ces bactéries cultivent facilement sur milieux ordinaires et utilisent des composés organiques simples comme source d'énergie (sucres, acides aminés, acides organiques). • L'espèce est responsable d'infections intestinales (gastro-entérites et diarrhées) leurs pouvoir pathogène est induit par des facteurs d'adhésion et/ou par la production d'entérotoxines (Leclerc et al., 1995).

Pour évaluer l'activité antibactérienne des extraits d'*Asphodelus microcarpus* et *Asphodelus tenuifolius* nous avons adopté la méthode de diffusion en milieu solide ou méthode des disques. Cette méthode consiste à déterminer le diamètre de la zone d'inhibition de la croissance microbienne autour de disque, ce qui traduit l'effet du produit antimicrobien sur la cible (**Bassole et al., 2001**).

II.5.2.1. Préparation de l'inoculum

Préparation de l'inoculum s'effectue en deux étapes, la préparation de la pré-culture et la préparation de la suspension bactérienne.

A. Préparation des pré-cultures

Dans une zone stérile à coté du bec benzène, on repique les différentes souches bactériennes utilisées (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) à l'aide d'une pipette pasteur stérile dans un bouillon nutritif (BN), puis elle est incubée à une température de 37°C pendant 24heures. Ensuite ces souches bactériennes ont été cultivées dans des boites de pétri contenant la gélose nutritive, pendant 18 heures à 37°C (**Bassole et al, 2001**).

B. Préparation de la suspension bactérienne

On prépare des suspensions bactériennes à partir des cultures de gélose en prélevant quelques colonies à l'aide d'une pipette Pasteur stérile et en l'introduisant dans des tubes à essai contenant 5 ml d'eau physiologique stérile. Après agitation par un vortex, on obtient des troubles au niveau du tube, l'ajustement de la suspension à une concentration de 10^5 à 10^6 UFC/ml (UFC : p

II.5.2.2. L'ensemencement

Dans des boites de Pétri de 9 cm de diamètres, les milieux de culture gélose mac conkey (milieu d'isolement des bactéries du genre *Escherichia coli*) et Chapman (milieu d'isolement sélectif des bactéries du genre *Staphylococcus*) ont été coulé et laissé refroidir et solidifier sur la paille, après chaque boites de Pétri est inoculé avec 1ml de la suspension microbienne fraîchement préparée (L'ensemencement est effectué dans 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum) à l'aide d'un râteau.

- **Dépôt des disques**

A la surface des boîtes inoculées on dépose à l'aide d'une pince stérilisée des disques à qui ont été stérilisés dans des tubes à essai dans l'autoclave. Chaque disque est imbibé de 20 μ l de l'extrait.

- **Lecture**

L'activité bactérienne se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibition de la croissance bactérienne autour des disques contenant l'extrait à tester.

La lecture s'effectue par la mesure du diamètre d'inhibition (D) mesuré à l'aide d'une règle, le résultat de cette activité est exprimé en mm.

Le micro-organisme testé est considéré comme :

Souche résistante (-) : $D < 8\text{mm}$

Souche sensible (+) : $9\text{mm} \geq D \leq 14\text{mm}$

Souche très sensible (++) : $15\text{mm} \geq D \leq 19\text{mm}$

Souche extrêmement sensible (+++) : $D > 20\text{mm}$.

II. 6. Analyse statistique

Les courbes et les histogrammes sont tracés par le Microsoft Excel 2007.

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne \pm écart-type SD. Les valeurs d'IC50 (concentration inhibitrice à 50%) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f (concentration)].

La figure 07 récapitule les différentes expériences réalisées sur les extraits de la partie aérienne (feuille et tige) et la partie sous terrain (racines) des deux plantes étudiées *Asphodelus microcarpus* (Fig.02) et *Asphodelus tenuifolius* (Fig.03).

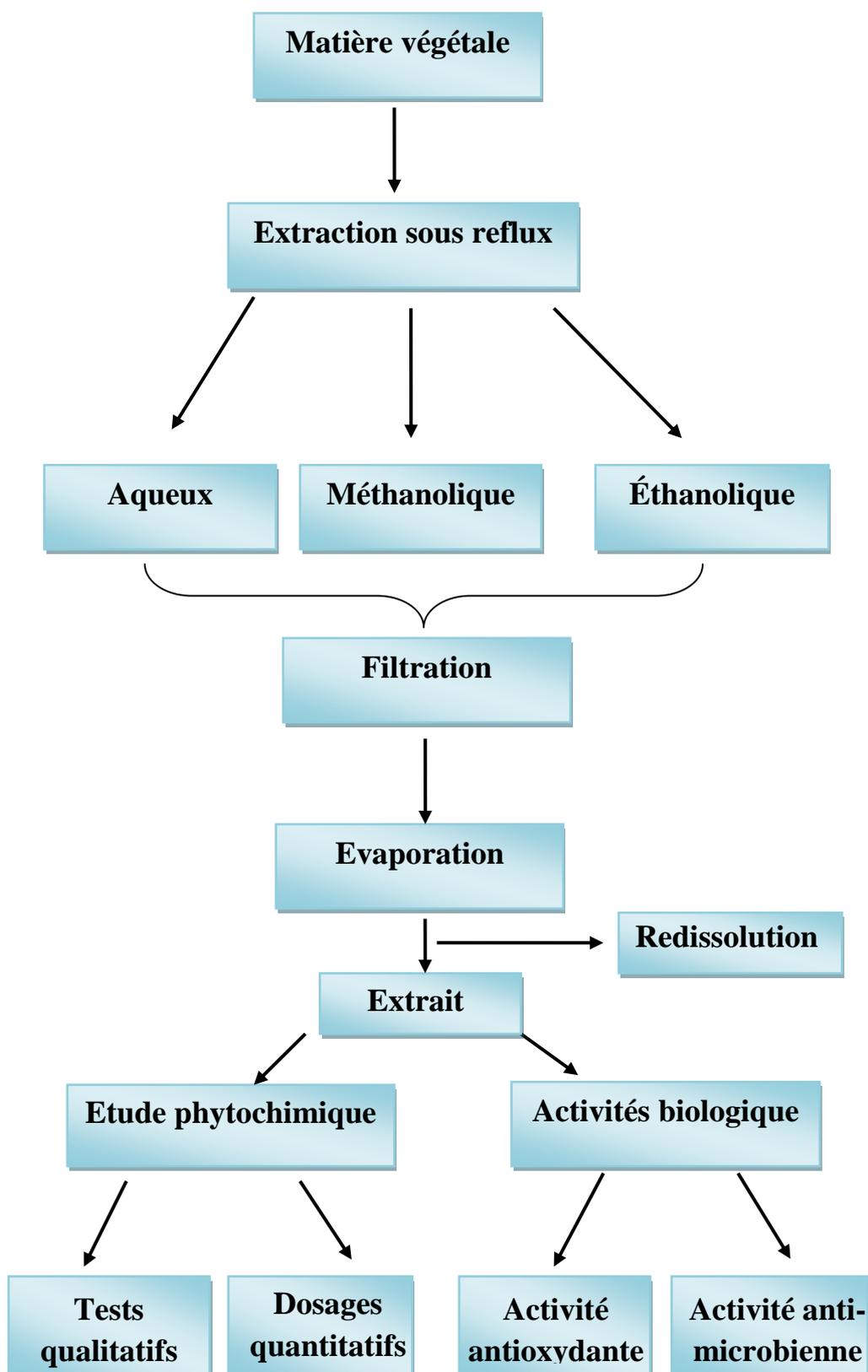


Figure 07: Schéma récapitulatif de tout la partie expérimental

I. Détermination du Taux d'humidité du matériel végétal

Le taux d'humidité est la quantité d'eau contenue dans le végétal frais.

Le taux d'humidité *Asphodelus microcarpus* et *Asphodelus tenuifolius* est récapitulé dans le tableau ci-après.

Tableau 5 : Taux d'humidité d' *Asphodelus microcarpus* et *Asphodelus tenuifolius*.

	<i>Asphodelus microcarpus</i>		<i>Asphodelus tenuifolius</i>	
	Partie aérienne (feuille +tige)	Partie sous terrain (racine)	Partie aérienne (feuille +tige)	Partie sous terrain (racine)
Taux d'humidité	86.19 %	84.52%	83.23 %	81.90 %
Écart type	(±0.06)	(±0.04)	(±0.05)	(±0.04)

D'après les résultats obtenus le taux d'humidité des feuilles et des racines d'*Asphodelus microcarpus* prévenant du nord algérien est de 86.19 % (±0.06), 84.52% (±0.04) respectivement, tandis que le taux d'humidité d'*Asphodelus tenuifolius* prévenant du sud algérien est de 83.23 % (±0.05), 81.90 % (±0.04). Ces différences sont probablement dues aux différences environnementales entre les régions.

II. Rendement d'extraction

Après extraction et évaporation des filtrats, les taux d'extraction sont calculés et les résultats obtenus sont présentés dans la figure 8 pour *Asphodelus microcarpus*, et la figure 9 pour *Asphodelus tenuifolius*.

II.1. *Asphodelus microcarpus*

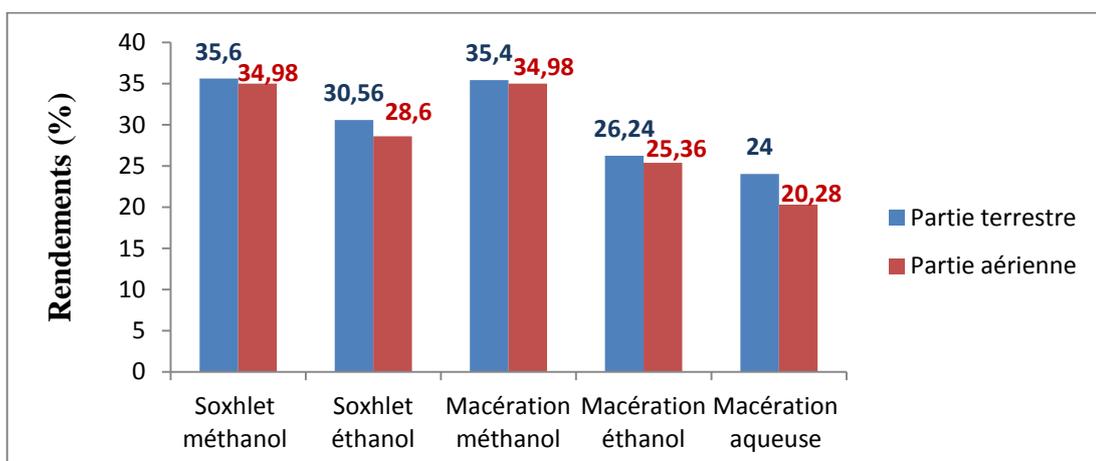


Figure 8: Rendement d'extraction de la partie sous terraine et aérienne d'*Asphodelus microcarpus*.

D'après la **figure 8**, nous remarquons que le rendement le plus élevé est obtenu par l'extracteur soxhlet. Et le solvant **eau /méthanol** aux proportions (30/70) (v/v) a permis d'obtenir le meilleur rendement dans la partie sous terraine (35.6 %) et dans la partie aérienne (34,98 %).

Les résultats obtenus (**Fig. 8**) montrent que la partie sous terraine d'*Asphodelus microcarpus* présente les taux d'extraction les plus élevés.

II.2. *Asphodelus tenuifolius*

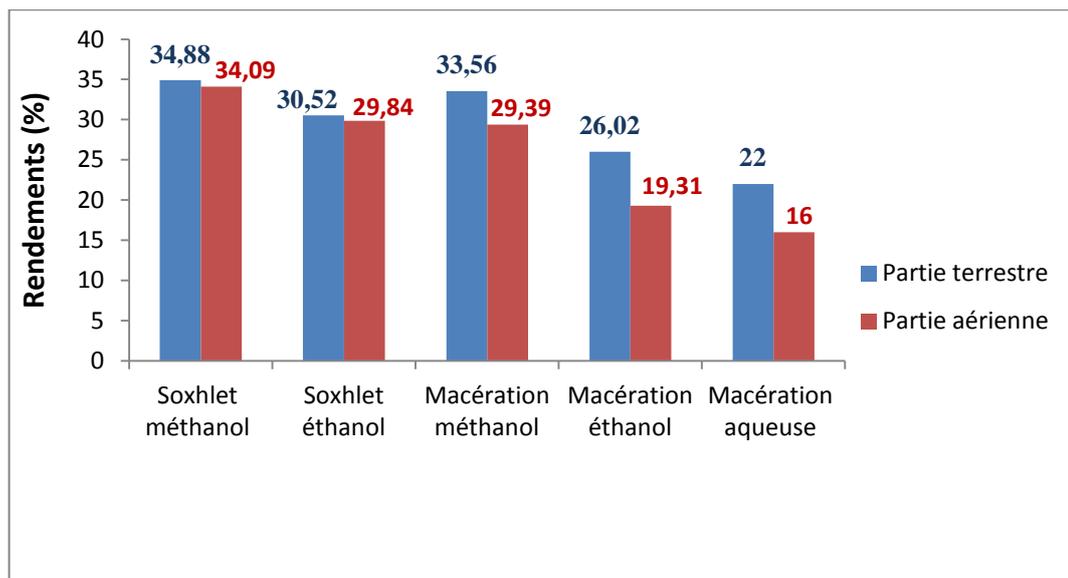


Figure 9: Rendement d'extraction de la partie sous terraine et aérienne d'*Asphodelus tenuifolius*

D'après les résultats présentés dans la **figure 9**, on remarque que le rendement le plus élevé est obtenu pour la méthode d'extraction par soxhlet avec des taux d'extraction d'ordre de 34,88% pour la partie sous terraine et 34,09% pour la partie aérienne. Le solvant **eau/méthanol** aux proportions (30/70) (v/v) a permis d'obtenir le meilleur rendement 34.88% pour la partie sous terraine et de 34.09 % pour la partie aérienne, suivis du solvant **eau/éthanol** (30/70) (v/v) avec un rendement de 30.52 % pour la partie sous terraine et de 29.84 % pour la partie aérienne. Ces résultats indiquent que la partie sous terraine d'*Asphodelus tenuifolius* présentent les taux d'extraction les plus élevées.

L'extraction peut être influencée par la méthode et le solvant d'extraction. Le choix du solvant d'extraction est primordial, il joue un rôle déterminant sur la quantité ainsi que sur le type de composés phénoliques à extraire et la sensibilité de ces derniers (Hayouni *et al.*, 2007). D'autres paramètres peuvent influencer le taux d'extraction à

savoir le temps d'extraction, la taille des particules, les conditions de préparation des échantillons, la durée et les conditions de stockage.

La figure 10 Récapitule les taux d'extraction des deux plantes étudiées *Asphodelus microcarpus* et *Asphodelus tenuifolius* par la méthode la plus efficace pour l'extraction : le solvant **eau/méthanol** aux proportions (30/70) (v/v) par l'extracteur soxhlet.

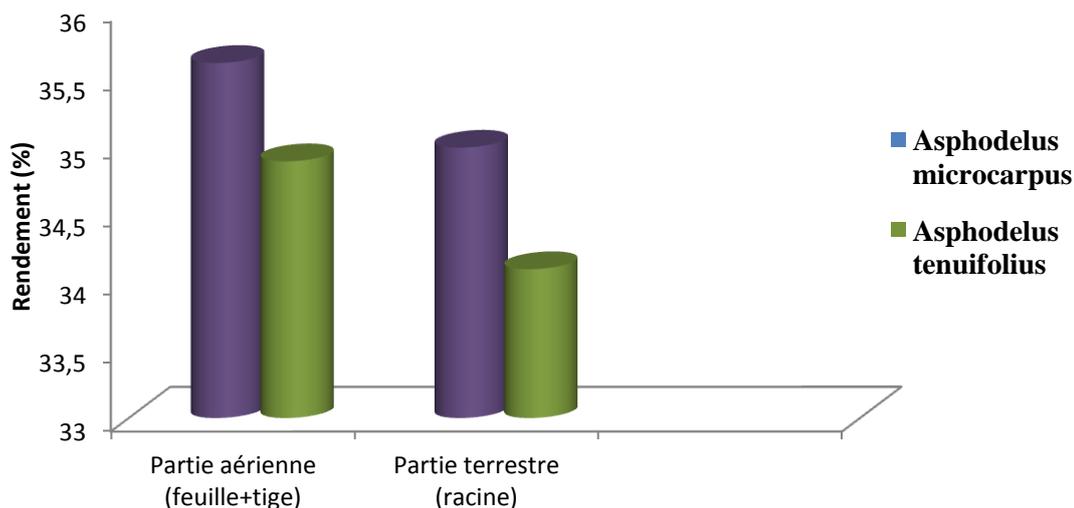


Figure 10 : Rendement d'extraction des deux plantes étudiées *Asphodelus microcarpus* et *Asphodelus tenuifolius*.

La figure 10 montre que les taux d'extraction d'*Asphodelus microcarpus* sont un peu plus élevés que les taux d'extraction *Asphodelus tenuifolius*. Cette différence pourrait être liée à la région de récolte des deux plantes *Asphodelus microcarpus* dans la région de wellad guefiffa wilaya de Bouira et *Asphodelus tenuifolius* dans la région de Ghardaia.

III. Tests phytochimiques

III.1. Dosage qualitatifs

La phytochimie qualitative permet de générer pour une première estimation des données préliminaires sur les différentes familles chimiques présentes chez les deux plantes *Asphodelus microcarpus* et *Asphodelus tenuifolius*, et ce par des réactions colorées et de précipitation.

III.1.1. *Asphodelus microcarpus*

Les résultats de dosage qualitatif réalisés sur les trois types d'extraits (éthanolique, méthanolique et aqueux) d'*Asphodelus microcarpus* sont présentés dans les tableaux 6. D'après les résultats obtenus nous remarquons la présence des flavonoïdes, des tanins, des quinones libres et des terpénoïdes dans la partie sous terraine ainsi que la partie aérienne de l'*Asphodelus microcarpus*.

L'analyse de ces résultats permet de constater que le solvant eau/méthanol (30 :70) (v/v) a extrait une quantité meilleure en familles chimiques par rapport aux autres solvants.

Tableau 6: Résultats du dosage qualitatif d'*Asphodelus microcarpus*.

Extrait	Composés phénoliques		Quinones libres	Terpénoïdes
	simple	complexes		
	Flavonoïdes	Tanins		
1. <i>Asphodelus microcarpus</i>				
1.1. <i>Asphodelus microcarpus</i> partie sous terrain				
A. Extrait méthanolique				
A.1. Soxhlet	+	+	++	++
A.2. Macération	+	+	-	+
B. Extrait éthanolique				
B.1. Soxhlet	+	+	++	-
B.2. Macération	+	+	++	+
C. Extrait aqueux				
C.1. Macération	+	+	++	+
1.2. <i>Asphodelus microcarpus</i> partie aérienne				
A. Extrait méthanolique				
A.1. Soxhlet	+	++	++	++
A.2. Macération	+	++	++	-
B. Extrait éthanolique				
B.1. Soxhlet	+	++	+	-
B.2. Macération	+	++	+	-
C. Extrait aqueux				
C.1. Macération	+	+	-	+

+ : Présence

Tanins : ++ : coloration bleu noirâtre ; + : coloration verdâtre

- : Absence

Quinones libres : ++ : rouge ; + : jaun

D'après le **tableau 7** la mousse est formée dans tous les extraits d'*Asphodelus microcarpus*, cette mousse est due à la saponification des extraits testés. Ce résultat reflète la présence des saponines dans les différents extraits.

Les résultats obtenus indiquent que les saponines sont présentes beaucoup plus dans les racines d'*Asphodelus microcarpus* que dans les feuilles et les tiges.

L'indice de mousse calculé pour les extraits obtenus à partir des racines est de l'ordre de 100 % pour l'extrait méthanolique. Ce résultat indique que le méthanol étant le solvant le plus efficace pour l'extraction des saponines.

La comparaison des deux méthodes d'extraction montre que l'extraction à froid (macération) étend la plus efficace pour la caractérisation des saponines.

Tableau 7: Résultats du dosage qualitatif des saponines d'*Asphodelus microcarpus*.

Extrait	Saponine										
1. <i>Asphodelus microcarpus</i>	Observation après 15 min										IM
1.1. <i>Asphodelus microcarpus</i> partie sous terrain											
A. Extrait méthanolique	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%	
A.1. Soxhlet	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	250
A.2. Macération	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	100
B. Extrait éthanolique	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%	
B.1. Soxhlet	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	333,3
B.2. Macération	+++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	250
C. Extrait aqueux	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%	
C.1. Macération	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
1.2. <i>Asphodelus microcarpus</i> partie aérienne											
A. Extrait méthanolique	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%	
A.1. Soxhlet	T	T	T	T	T	T	+	+	++	++	500
A.2. Macération	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++	250
B. Extrait éthanolique	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%	
B.1. Soxhlet	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	/
B.2. Macération	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	/
C. Extrait aqueux	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%	
C.1. Macération	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	/

T : présence des saponines en état de traces

+ : 0.5 < Hauteur de mousse < 0.

++ : Hauteur de mousse = 1 cm

+++ : Hauteur de mousse > 1cm

III.1.2. *Asphodelus tenuifolius*

D'après les résultats (**Tab.8 et de Tab.9**) nous remarquons la présence des flavonoïdes, des tannins, des quinones libres et des terpénoïdes et des saponines dans la partie sous terraine ainsi que dans la partie aérienne de l'*Asphodelus tenuifolius*.

L'analyse de ces résultats permet de constater que le méthanol extrait une quantité meilleure en familles chimiques par rapport aux autres solvants.

L'indice de mousse calculé pour les extraits obtenus à partir des racines (**Tab.9**) est de l'ordre de 100 % pour l'extrait méthanolique. Ce résultat indique que le méthanol étant le solvant le plus efficace pour l'extraction des saponines, et que la macération est plus efficace pour la caractérisation des saponines.

Tableau 8: Résultats du dosage qualitatif d'*Asphodelus tenuifolius*.

Extrait	Composés phénoliques		Quinones libres	Terpénoïdes
	simple	complexes		
	Flavonoïdes	Tanins		
2. <i>Asphodelus tenuifolius</i>				
2.1. <i>Asphodelus tenuifolius</i> partie sous terrain				
A. Extrait méthanolique				
A.1. Soxhlet	++	++	++	++
A.2. Macération	+	+	++	+
B. Extrait éthanolique				
B.1. Soxhlet	+	++	++	+
B.2. Macération	-	+	+	-
C. Extrait aqueux				
C.1. Macération	+	++	++	+
2.2. <i>Asphodelus tenuifolius</i> partie aérienne				
A. Extrait méthanolique				
A.1. Soxhlet	++	++	++	+
A.2. Macération	+	++	++	+
B. Extrait éthanolique				
B.1. Soxhlet	+	++	++	-
B.2. Macération	-	++	++	-
C. Extrait aqueux				
C.1. Macération	+	+	-	+

+ : Présence

Tanins : ++ : coloration bleu noirâtre ; + : coloration verdâtre

- : Absence

Quinones libres : ++ : rouge ; + : jaune

Tableau 9: Résultats de dosage qualitatif des saponines d'*Asphodelus tenuifolius*

Extrait	Saponosides										
	Observation après 15 min										
2. <i>Asphodelus tenuifolius</i>											
2.1. <i>Asphodelus tenuifolius</i> partie sous terrain											
A. Extrait méthanolique	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%	
A.1. Soxhlet	+	+	+	++	++	++	++	+++	+++	++	250
A.2. Macération	++	+++	+++	++	++	++	++	+++	+++	+++	100
B. Extrait éthanolique	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%	
B.1. Soxhlet	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	++	250
B.2. Macération	T	T	T	T	+	+	+	+	++	++	500
C. Extrait aqueux	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%	
C.1. Macération	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
2.2. <i>Asphodelus tenuifolius</i> partie aérienne											
A. Extrait méthanolique	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%	
A.1. Soxhlet	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
A.2. Macération	T	T	T	T	T	+	+	++	++	++	
B. Extrait éthanolique	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%	
B.1. Soxhlet	T	T	T	-	-	-	-	-	-	-	
B.2. Macération	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
C. Extrait aqueux	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%	
C.1. Macération	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

T : présence des saponines en état de traces

+ : 0.5 < Hauteur de mousse < 0.

++ : Hauteur de mousse = 1 cm

+++ : Hauteur de mousse > 1cm

Au regard des résultats obtenus à partir de l'étude phytochimique qualitatif, il ressort que le solvant eau / méthanol aux proportions (30/70) (v/v) est plus efficace pour une première caractérisation de différents composés chimiques présentes dans les deux plantes étudiées (*Asphodelus microcarpus* et *Asphodelus tenuifolius*) par rapport aux autres solvants : eau / ethanol aux proportions (30/70) (v/v) et eau bi-distillée.

III.2. Dosage quantitatif

III.2.1. Dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins

III.2.1.1. les phénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué selon la méthode au réactif de Folin Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999) et l'acide gallique a été utilisé comme étalon.

La courbe d'étalonnage réalisée avec l'étalon acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux est représentée dans la **figure 11**.

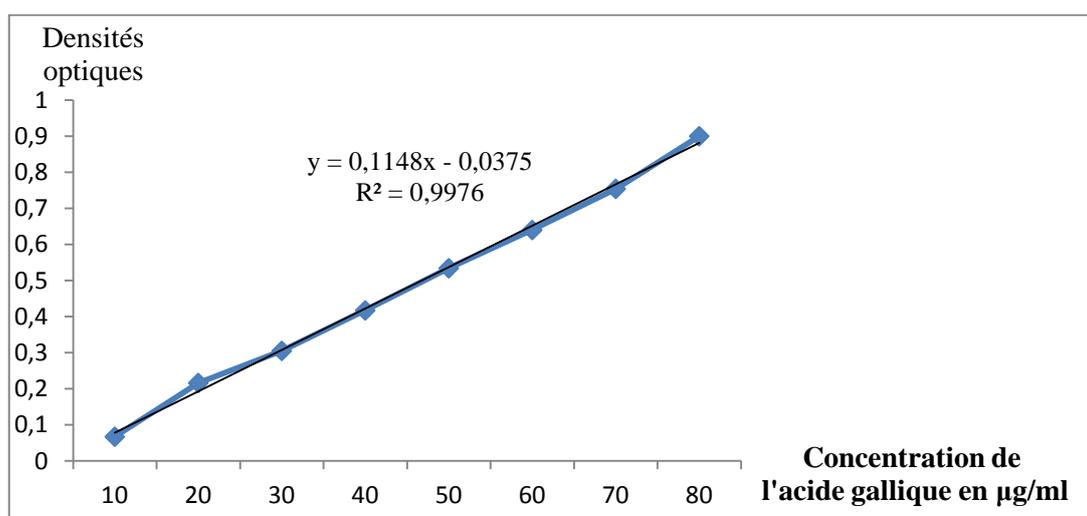


Figure 11 : La courbe d'étalonnage réalisée avec l'étalon acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

a. *Asphodelus microcarpus*

Les résultats de dosage des phénols totaux pour *Asphodelus microcarpus* sont portés dans la **figure 12**.

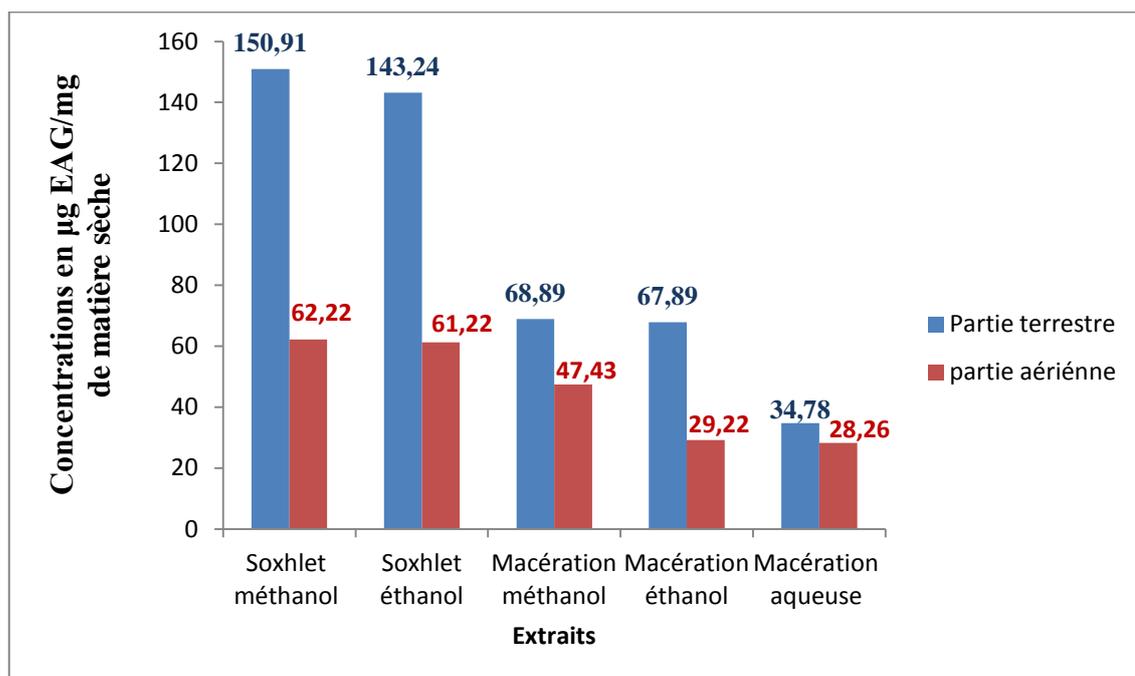


Figure12: Teneurs en polyphénols totaux dans les extraits l'*Asphodelus microcarpus*.

D'après les résultats portés dans la figure 12, la plus grande quantité des polyphénols totaux est détectée dans la partie sous terraine d'*Asphodelus microcarpus* (150.91 ugEAG/mg de MS), suivie de la partie aérienne (62.22 ugEAG/mg de MS).

Selon les résultats enregistrés la méthode d'extraction par soxhlet donne une teneur en polyphénols totaux de 150.91 µg EAG/mg de MS pour le solvant eau/méthanol et de 143.24 µg EAG/mg de MS pour le solvant eau /éthanol, dans la partie sous terraine, et dans la partie aérienne la quantité des polyphénols est de l'ordre de 62.22 EAG/mg de MS et 61.22 EAG/mg de MS pour le solvant eau/ méthanol et eau/ éthanol respectivement. Ces teneurs sont supérieures à ceux obtenues par macération (68.89µg EAG/mg de MS, 67.89 µg EAG/mg de MS et 34.78 EAG/mg de MS pour les solvants eau/méthanol, eau /éthanol et eau –bi distillée respectivement, dans la partie sous terraine, et 42.43µg EAG/mg de MS, 29.26 µg EAG/mg de MS et 28.26 EAG/mg de MS pour les solvants eau/méthanol, eau /éthanol et eau b-distillée respectivement, dans la partie aérienne).

b. *Asphodelus tenuifolius*

Les résultats de dosage des phénols totaux pour *Asphodelus tenuifolius* sont portés dans la **figure 13**.

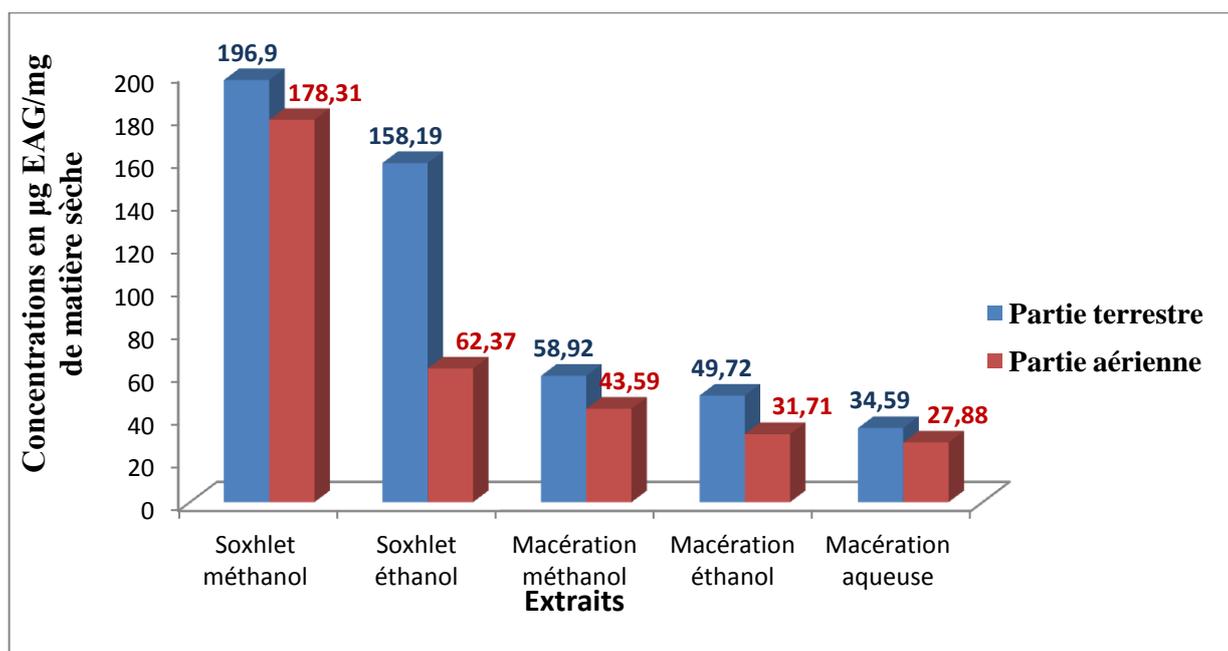


Figure 13: Teneurs en polyphénols totaux dans les extraits *d'Asphodelus tenuifolius*.

D'après les résultats obtenus pour *Asphodelus tenuifolius* (**Fig.13**) la méthode et le solvant qui donne des teneurs les plus élevées en phénols totaux est soxhlet par méthanol avec des valeurs de 196.90 µg EAG/mg MS dans la partie sous terraine et 178.31 µg EAG/mg MS dans la partie aérienne, suivi par la méthode de macération. Ces résultats reflètent la richesse de la partie sous terraine en composés phénoliques.

III.2.1.2. Les flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium (**Kim et al., 2003**) et la catéchine a été utilisé comme étalon (**Fig.14**). Les teneurs sont exprimées en µg d'équivalent catéchine par mg de matière sèche (µg EC/mg MS).

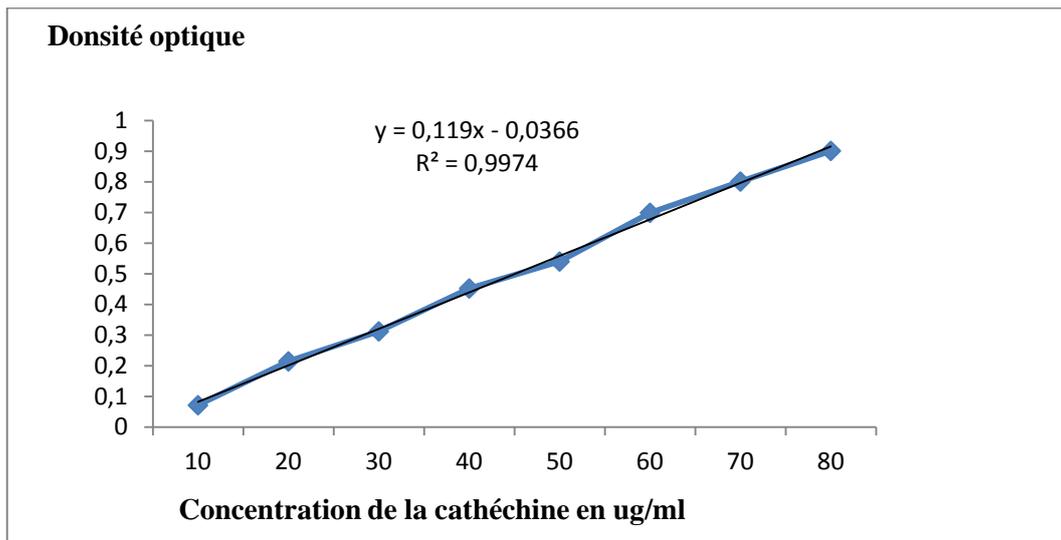


Figure 14: Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.

a. Asphodelus microcarpus

Les résultats de dosage de flavonoïdes d' *Asphodelus microcarpus* sont portés dans la figure 15.

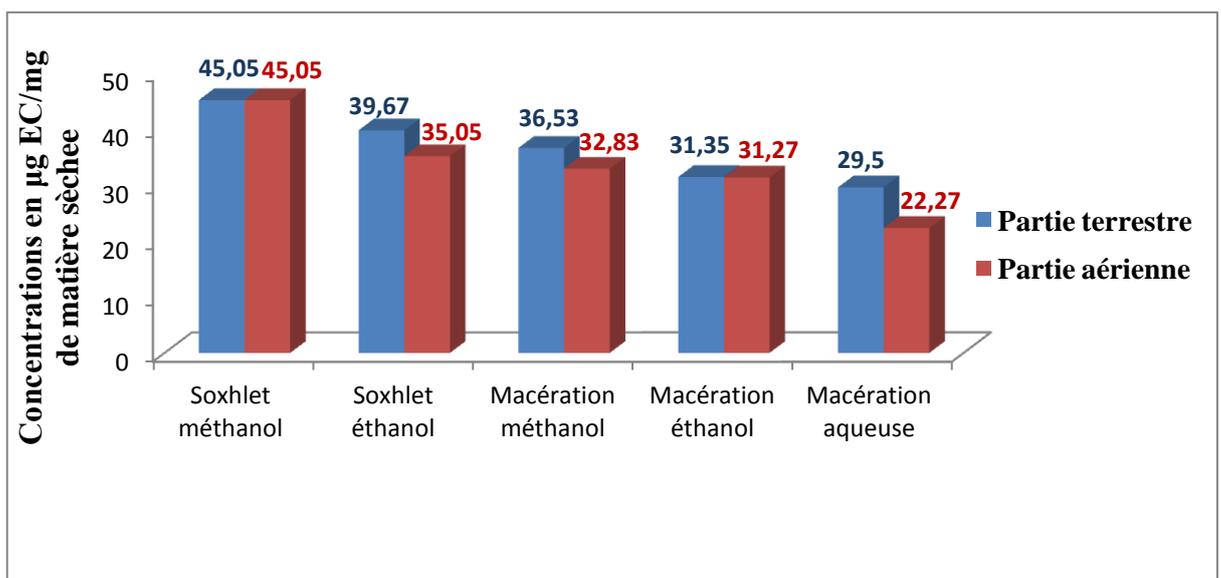


Figure 15 : Teneurs en Flavonoïde dans les extraits d'*Asphodelus microcarpus* étudiés.

les résultats obtenus (**Fig.15**) pour le dosage des flavonoïdes indiquent que la méthode d'extraction par soxhlet en utilisant le solvant eau/ méthanol présente la teneur la plus élevée des flavonoïdes (45,05 µg EC/mg de MS dans la partie sous terrain et 42,44 µg EC/mg de MS dans la partie aérienne), suivi par la méthode de macération, les extraits méthanolique 2thAnolique et aqueux ont montré respectivement les concentrations suivantes : 36.53 µg EC/mg de MS, 31.35 µg EC/mg de MS, 29.5 µg EC/mg de MS pour la partie sous terrain respectivement, et 32.83 µg EC/mg de MS, 31.27 µg EC

C/mg de MS, 22.27 μg E C/mg de MS pour la partie aérienne respectivement. Ces résultats indiquent que les flavonoïdes sont très abondants dans la partie sous terraine d'*Asphodelus microcarpus* que la partie aérienne.

b. *Asphodelus tenuifolius*

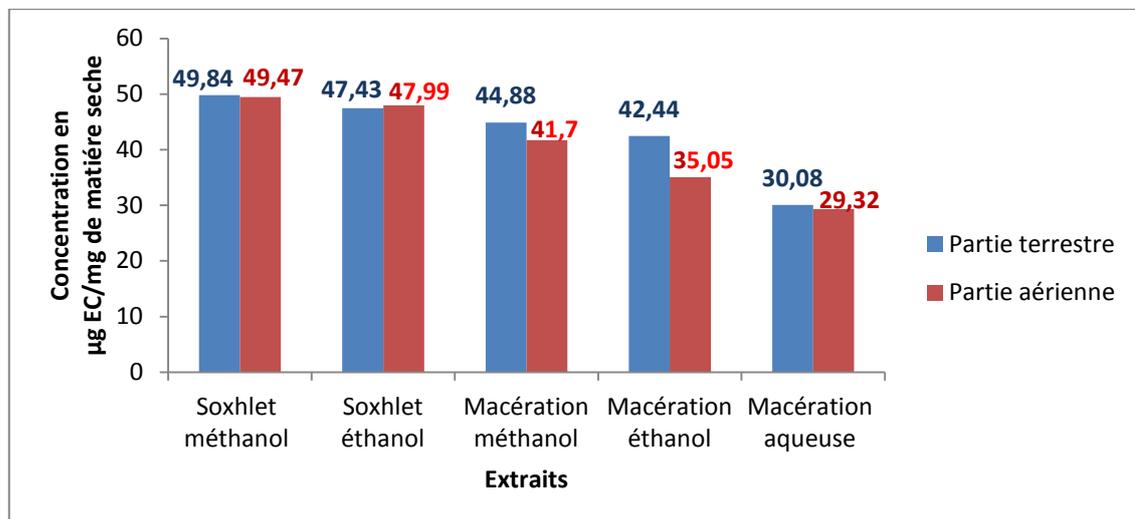


Figure 16: Teneurs en Flavonoïde dans les extraits d'*Asphodelus tenuifolius*.

Les résultats de dosage de flavonoïde (**Fig.16**) montrent que la partie sous terraine d'*Asphodelus tenuifolius* est riche en flavonoïde que la partie aérienne. Ils contiennent respectivement 49.84 μg EC/mg de MS et 49.47 μg EC/mg de MS pour la méthode d'extraction par soxhlet en utilisant le solvant eau/méthanol cette méthode représente la méthode la plus rentable pour le dosage quantitatif des flavonoïdes pour *Asphodelus tenuifolius*.

III.2.1.3. Les tannins

Le dosage des tanins a été effectué selon la méthode à la vanilline (**Sun et al., 1998**), et l'étalon utilisé été la quercétine (**Fig.17**). Les résultats sont exprimés en μg d'équivalent quercitrine par mg de la matière sèche (μg EQ/mg MS).

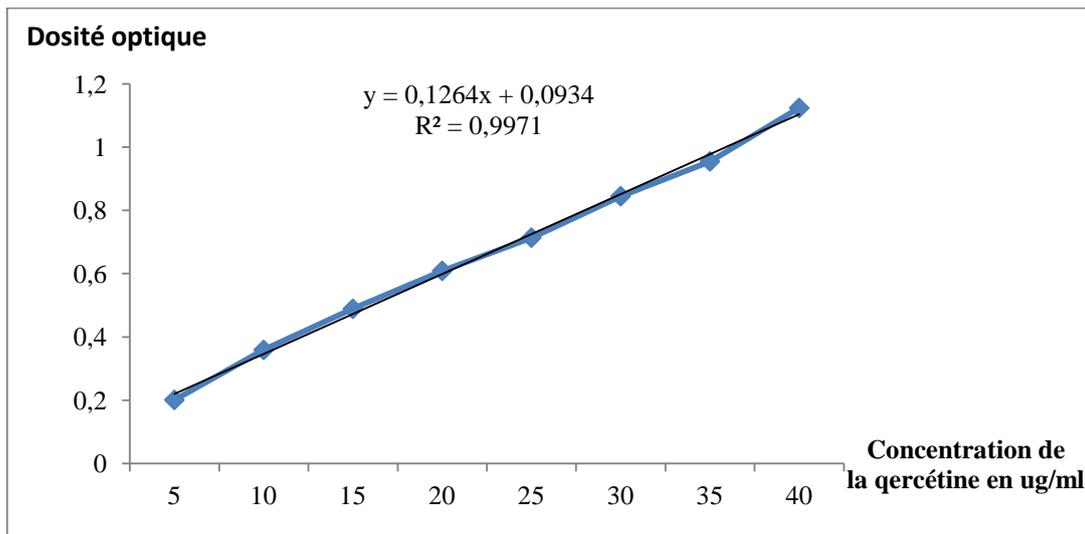


Figure 17 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins.

a. *Asphodelus microcarpus*

Les résultats de dosage des tanins pour *Asphodelus microcarpus* sont portés dans la figure 18.

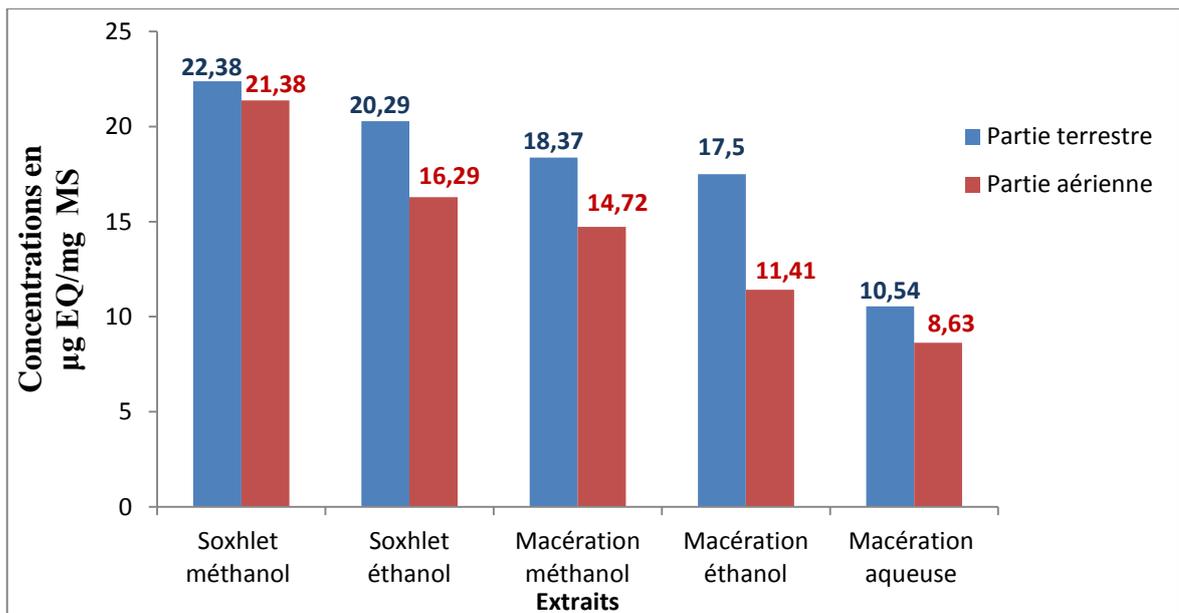


Figure 18: teneurs en tanin dans les extraits de *Asphodelus microcarpus* étudiés.

Les résultats de dosage des tanins dans *Asphodelus microcarpus* montre que c'est les extraits de la partie sous terrain qui possèdent la teneur la plus élevés en tanins (**Fig.18**) et ceux pour toute les méthodes d'extraction et les solvant utilisés.

La teneur des tanins des extraits *Asphodelus microcarpus* est bien évaluée par la méthode d'extraction par soxhlet avec le solvant eau/méthanol pour les deux parties

terrestres et aérienne avec des teneurs de l'ordre de 22.38 de $\mu\text{g EQ/mg MS}$ et 21.38 $\mu\text{g EQ/mg MS}$ respectivement.

b. *Asphodelus tenuifolius*

La teneur en tanins des différents extraits est donnée dans la figure 19.

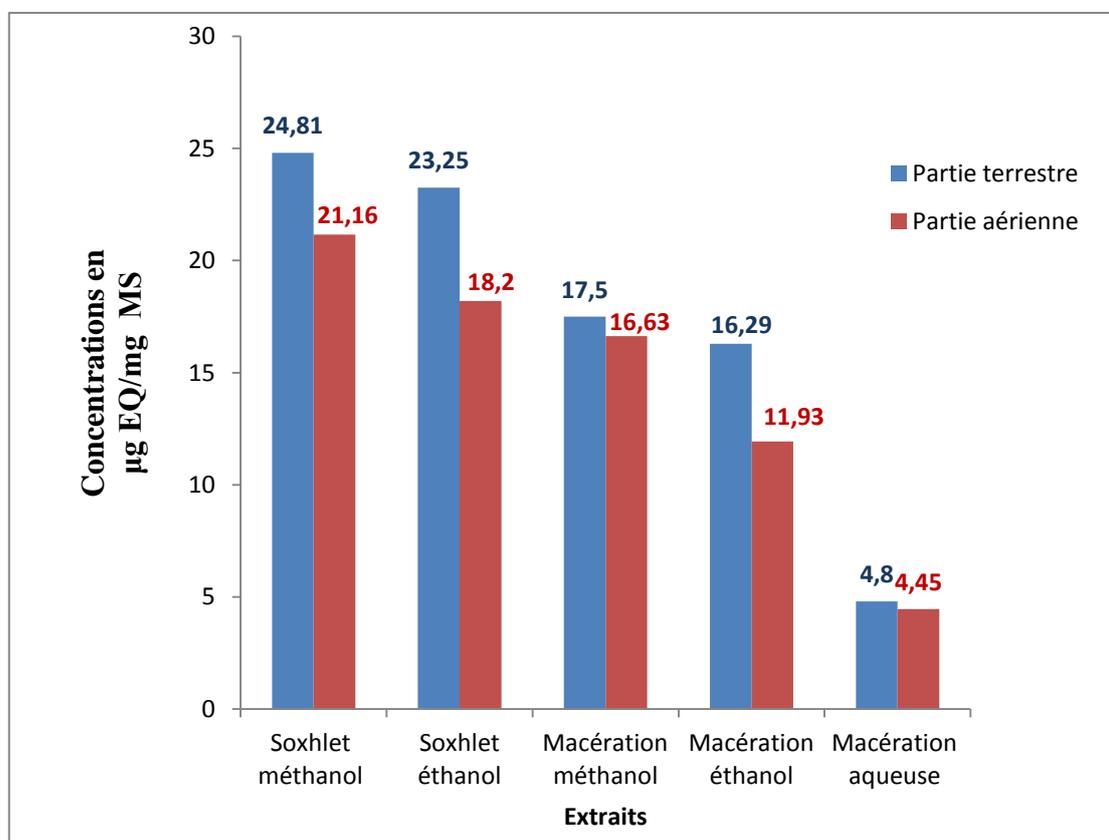


Figure 19: Teneurs en tanin dans les extraits de l'*Asphodelus tenuifolius*.

D'après les résultats de la figure 19 les extraits de la partie sous terraines de l'*Asphodelus tenuifolius* sont plus riches en tanins que les extraits de la partie aérienne. Et ils contiennent respectivement 24.81 $\mu\text{g EQ/mg MS}$ et 21.16 (pour l'extraction par soxhlet eau/méthanol). Ces teneurs représentent les valeurs les plus élevées en comparaison avec les autres méthodes et solvant utilisés (Fig.19), ce qui nous laisse suggérer que l'extraction par l'extracteur soxhlet avec eau/méthanol permet un meilleur dosage quantitatif des tannins pour l'*Asphodelus tenuifolius*.

Les résultats enregistrés dans les figures (12, 13, 15,16, 18, 19) montrent que l'extraction par soxhlet en utilisant le solvant eau/méthanol avec les proportions (30/70) (v/v) est plus efficace pour le dosage quantitatif des polyphénols totaux, des flavonoïdes

et des tannins dans les deux plantes étudiées *Asphodelus microcarpus* et *Asphodelus tenuifolius*.

Le tableau 10 récapitule les teneurs des poly phénols totaux, des flavonoïdes et des tanins des deux plantes étudiées *Asphodelus microcarpus* et *Asphodelus tenuifolius* par la méthode la plus efficace pour l'extraction : le solvant eau/méthanol aux proportions (30/70) (v/v) par l'extracteur soxhlet.

Tableau 10 : Les teneurs en poly phénols totaux, des flavonoïdes et des tanins des deux plantes étudiées *Asphodelus microcarpus* et *Asphodelus tenuifolius*.

plante teneurs	<i>Asphodelus microcarpus</i>		<i>Asphodelus tenuifolius</i>	
	Partie sous terrain	Partie aérienne	Partie sous terrain	Partie aérienne
Teneurs en polyphénols totaux en µg EAG/mg de MS	196.90	178.31	150.91	62.22
Teneurs en Flavonoïde totaux en µg EC/mg de MS	45.05	12.44	49.43	47.44
Teneurs en Tanins en µg EQ/mg de MS	22.38	21.29	24.81	21.16

Le tableau 10 montre que :

- La plus grande quantité des polyphénols totaux à été détectée dans les extraits de la partie sous terrain et aérienne d'*Asphodelus microcapus*.

- **Le pourcentage des flavonoïdes et des tanins dans les polyphénols**

En comparant le pourcentage des flavonoïdes et des tanins dans les polyphénols totaux pour les extraits issus de l'extraction par soxhlet avec eau/méthanol (30/70) (v/v) nous obtiendrons les résultats représentés dans la figure suivante.

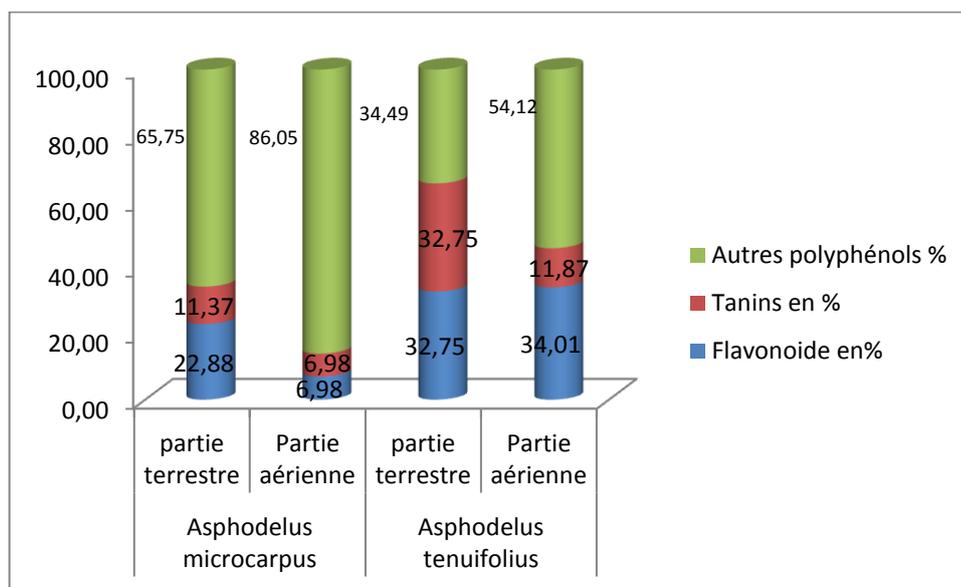


Figure 20: Le pourcentage des flavonoïdes et des tanins dans les polyphénols totaux.

D'après les résultats portés dans la figure 20 nous remarquons que:

- d'autres composés phénoliques possédant d'autres structures chimiques que celles des flavonoïdes et des tanins (acides phénoliques, Quinones libres...) présentant le plus grande pourcentage des composés phénoliques d' *Asphodelus microcarpus* et d' *Asphodelus tenuifolius*.

III.2.2. Dosage de la chlorophylle *a*, *b*, et caroténoïdes

Les résultats de dosage quantitative de la chlorophylle *a*, *b*, et caroténoïdes des différents extraits obtenus par macération et l'extraction par soxhlet sont représentés dans la figure 21 et la figure 22 pour la partie aérienne d' *Asphodelus microcarpus* et *Asphodelus tenuifolius*.

a. Asphodelus microcarpus

Tableau 11: Les concentration de la chlorophylle a, b et des caroténoïdes des extraits d'*Asphodelus microcarpus*.

Extrait	La concentration la chlorophylle a	La concentration la chlorophylle b	La concentration des caroténoïdes
Soxhlet méthanol	50,69	77,86	1,34
Soxhlet éthanol	45.95	56.87	8.27
Macération méthanol	28.95	32.97	3.83
Macération éthanol	21,35	24,58	2,06
Macération	15,03	16,61	8,08

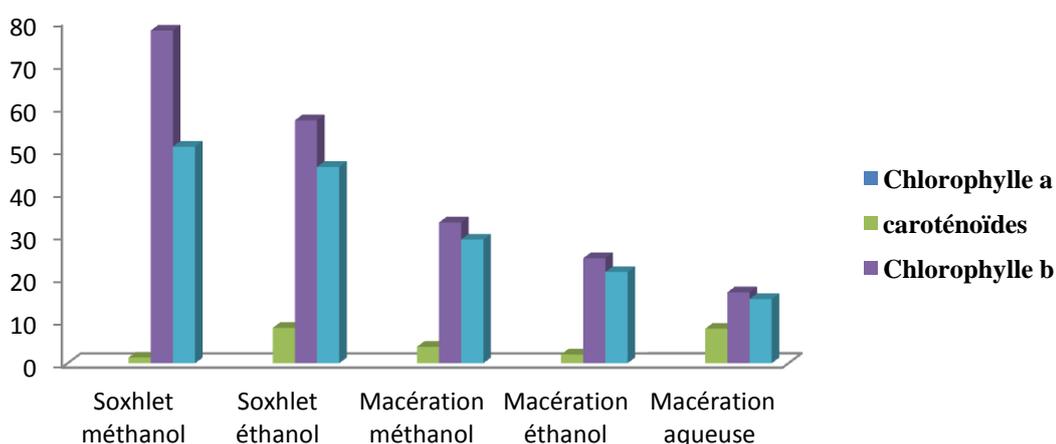


Figure 21: Concentration en chlorophylle a, chlorophylle b et caroténoïdes dans les différents extraits d'*Asphodelus microcarpus*

La figure 21 montre que la teneur de la chlorophylle a et b de la partie aérienne d'*Asphodelus microcarpus* est très élevés dans les extraits obtenus par la méthode de soxhlet pour les deux solvants utilisées méthanol et éthanol. Tandis que, le taux le plus élevé des caroténoïdes est enregistré pour l'extrait obtenu par la méthode de soxhlet éthanol (fig. 21).

b. Asphodelus tenuifolius

Tableau 12: Les concentration de la chlorophylle a, b et des caroténoïdes des extraits d'*Asphodelus tenuifolius*.

Extrait	La concentration la chlorophylle a	La concentration la chlorophylle b	La concentration des caroténoïdes
Soxhlet méthanol	73,2	80,46	6,46
Soxhlet éthanol	55.34	58.84	36.56
Macération méthanol	13.31	16.48	4.96
Macération éthanol	14,41	13,38	6,33
Macération	12,54	12,52	9,28

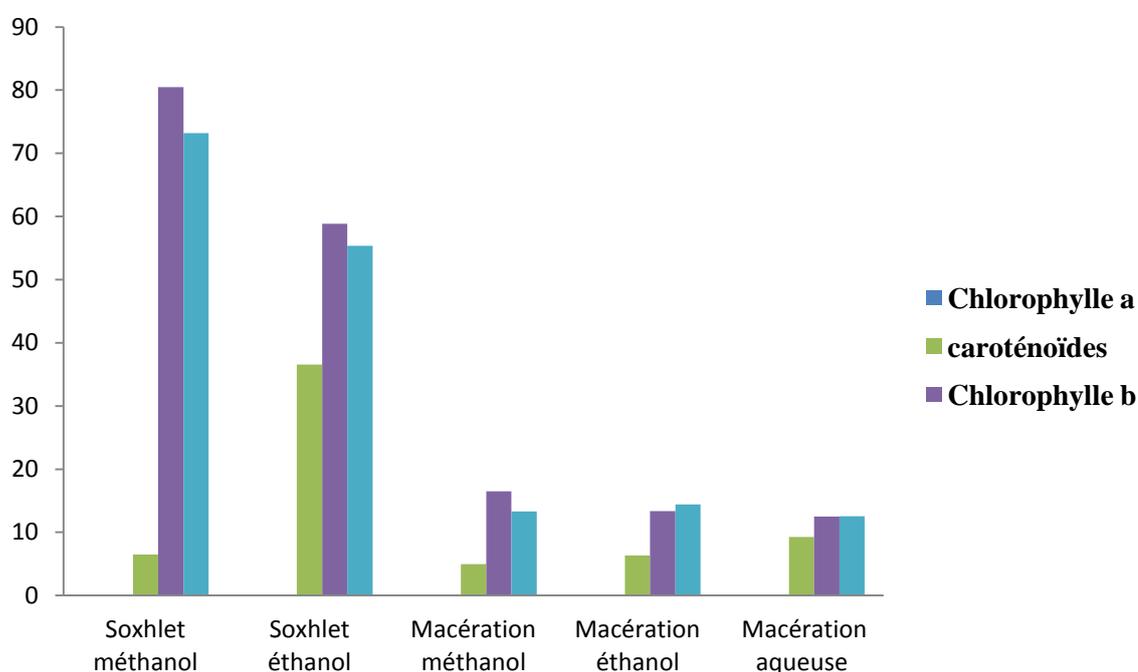


Figure 22: Concentration en chlorophylle a, chlorophylle b et caroténoïdes des différents extraits d'*Asphodelus tenuifolius*.

D'après la figure 22 on a enregistré une concentration très élevée de la chlorophylle a et b dans les extraits éthanolique et méthanolique de la partie aérienne d'*Asphodelus tenuifolius* par la méthode de soxhlet.

La teneur la plus élevée des caroténoïdes est enregistré dans l'extrait éthanolique obtenu par l'utilisation de l'extracteur soxhlet.

IV. Activités biologiques

IV.1. Activité antioxydant

Les antioxydants dérivés des plantes sont largement utilisés en raison de leur intérêt sécuritaire par rapport aux antioxydants synthétiques. Ces antioxydants réduisent le stress oxydatif dans les cellules car ce sont des agents réducteur puissants et agissent en tant que piègeur des radicaux libres.

Dans le présent travail nous avons utilisés une méthode photométrique : le test de piégeage du radical libre 2,2-diphényl-1 picrylhydrazyle (DPPH) pour évaluer *in vitro* l'activité anti-oxydantes des extrais d'*Asphodelus microcarpus* et d'*Asphodelus tenuifolius*.

Les extraits utilisés pour évaluer l'activité antioxydante se sont les extraits issus d'une extraction par soxhlet avec eau/methanol (30/70) (v/v) car ils représentent les teneurs les plus élevés des polyphénols responsables d'une activité antioxydante importante. L'activité antioxydante des polyphénols des plantes à été monté par plusieurs études.

Le test de DPPH est une méthode largement utilisée dans l'étude de l'activité antioxydante. Le radical DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl) se caractérise par sa capacité de former des radicaux libres stables. La présence de ces radicaux DPPH donne lieu à une coloration violette foncée de la solution, qui absorbe aux environs de 517 nm. La réduction des radicaux DPPH par un agent antioxydant entraîne une décoloration de la solution.

Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des extraits.

Les valeur de IC₅₀ est calculé pour chaque extrait d'*Asphodelus microcarpus* et d'*Asphodelus tenuifolius*. IC₅₀ est défini comme étant la concentration d'extrait pour la quelle l'absorbance est égale à 0.5*A₀. Ainsi une valeur faible de IC₅₀ indique une activité antioxydante élevée.

Les résultats de l'activité anti-oxydante obtenus pour les testes de DPPH appliqués aux extraits de la partie terrestre et de la partie aérienne d'*Asphodelus microcarpus* et d'*Asphodelus tenuifolius* sont présentés dans la figure 23

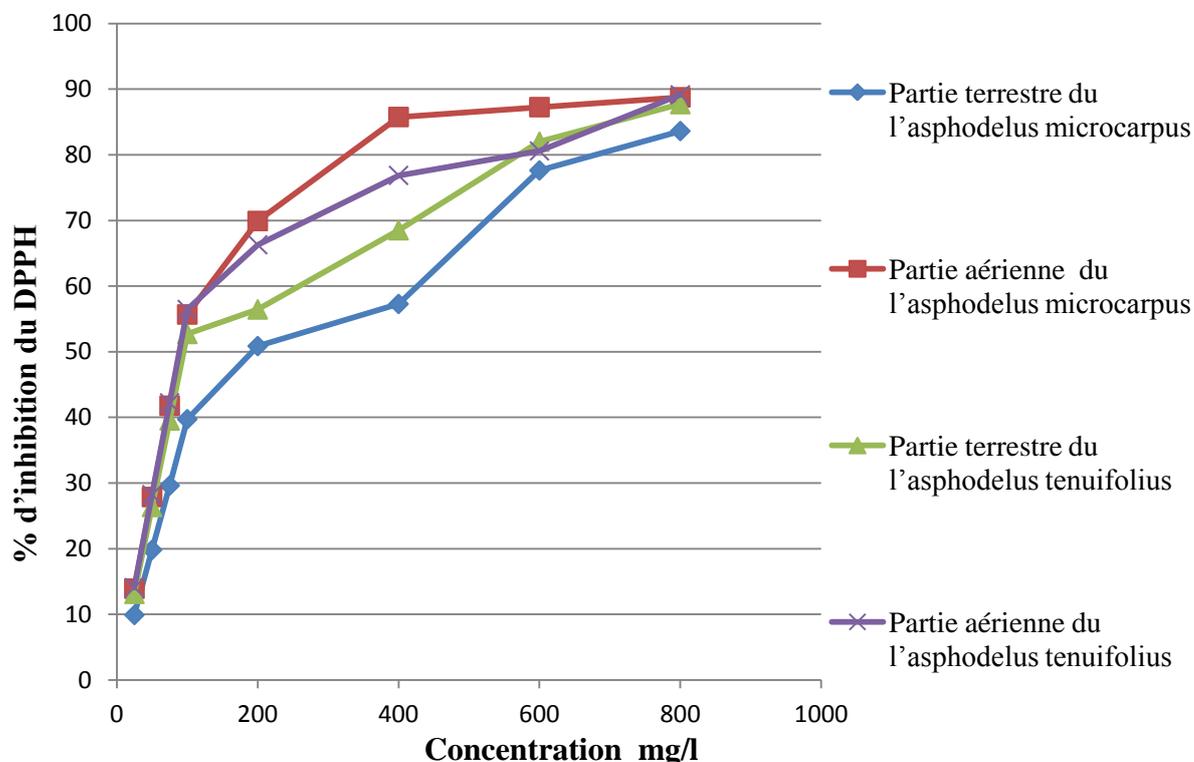


Figure 23: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait éthanolique

L'allure de courbes reportées dans la figure 23 montre que l'augmentation de la concentration des extraits induit à une augmentation de leur pouvoir antioxydant.

D'après les résultats obtenus, on note pour une concentration de 25ug/ml un pouvoir antioxydant de l'ordre de 14.08%, 13.90%, 13.12 % et de 9.9 % (pour les extraits obtenus respectivement à partir de la partie aérienne d'*Asphodelus tenuifolius*, de la partie aérienne d'*Asphodelus microcarpus*, de la partie sous terrainne d'*Asphodelus tenuifolius*, et de la partie sous terrainne *Asphodelus microcarpus*). Ce pouvoir antioxydant augmente jusqu'à 80 % pour une concentration de 800ug/ml, il est de l'ordre de 89.13 % pour l'extrait la partie aérienne d'*Asphodelus microcarpus*, de 87.73 % pour l'extrait de la partie sous terrainne *Asphodelus microcarpus*, de 83.62 % pour l'extrait de la partie sous terrainne d'*Asphodelus tenuifolius* et de 88.76 pour l'extrait de la partie aérienne d'*Asphodelus tenuifolius*.

À partir des équations des régressions linéaires des graphes représentés dans les **figures 23 (annexe II)** nous avons calculé les IC_{50} des extraits d'*Asphodelus microcarpus* et d'*Asphodelus tenuifolius*. Les valeurs des IC_{50} sont représentées dans le **Tableau 13**: Valeurs des IC_{50} des extraits extraits d'*Asphodelus microcarpus* et d'*Asphodelus tenuifolius*.

	<i>Asphodelus microcarpus</i>		<i>Asphodelus tenuifolius</i>		
	Partie sous terraines	Partie aérienne	Partie sous terraines	Partie aérienne	BHT
IC_{50} exprimée en $\mu\text{g/ml}$	178,859	89,789	94,826	88,657	8,655

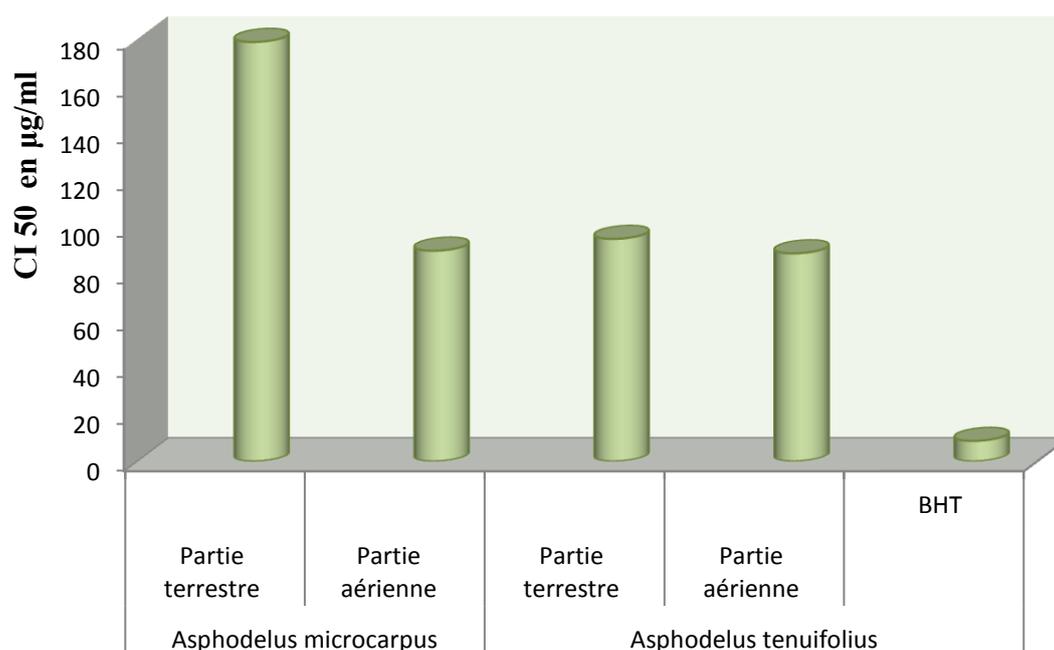


Figure 24: Activité anti-radicalaire des extraits d'*Asphodelus* et le BHT.

D'après les valeurs obtenues nous constatant que la capacité réductrice des extraits d'*Asphodelus microcarpus* et d'*Asphodelus tenuifolius* est inférieure à celle de BHT qui présente un IC_{50} de 8.655 ug/ml.

La partie aérienne d'*Asphodelus tenuifolius* présente le pouvoir anti-oxydant le plus élevé avec une IC₅₀ de 88.8 ug/ml. Et la partie sous terrain de *Asphodelus microcarpus* présente le pouvoir le plus faible avec une IC₅₀ de 178.859 ug/ml.

IV.2. Activité anti-bactérienne

Le tableau suivant présente les effets antibactériens des extraits des deux plantes sur la croissance de souches bactériennes testées (*S.aureus* et *E. coli*).

Tableau 14: Les diamètres des zones d'inhibition (mm) des souches bactériennes provoquées par les extraits de *Asphodelus microcarpus* et *Asphodelus tenuifolius*

Extraits \ Souches	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Asphodelus microcarpus</i> (les feuilles) Macération par méthanol	(-)	13 mm
<i>Asphodelus microcarpus</i> (les racines) Macération par méthanol	(-)	12 mm
<i>Asphodelus tenuifolius</i> (les tiges) Soxhlet par méthanol	(-)	11 mm
<i>Asphodelus tenuifolius</i> (les racines)	(-)	10 mm

D'après les résultats de tableau (14) et de la figure (25), Il apparaît que l'extrait d'*Asphodelus microcarpus* et *Asphodelus tenuifolius* semble avoir une action inhibitrice légère sur la croissance du *Staphylococcus aureus* (le diamètre de la zone d'inhibition compris entre 10 et 14 mm), en revanche aucun effet antibactérien n'a pu être décelé sur *Escherichia coli* (diamètre d'inhibition tout à fait nul). Ces bactéries ont montré un grand potentiel de résistance contre l'action antibactérienne de l'ensemble des extraits d'*Asphodelus microcarpus* et *Asphodelus tenuifolius*.

La grande résistance de la souche *E.Coli* bactéries à Gram négatif peut être liée en partie à la complexité de l'enveloppe cellulaire de ces micro-organismes qui contiennent une double membrane. La sensibilité de la souche *S. aureus* peut s'expliquer par la probabilité de la sensibilité des bactéries Gram⁺ aux changements environnementaux externe (tels que la température, le pH et la présence des extraits naturels) est due à l'absence de la membrane externe).

	Escherichia coli	Staphylococcus aureus
<p><i>Asphodelus microcarpus</i> (les feuilles) Macération par méthanol</p>		
<p><i>Asphodelus microcarpus</i> (les racines) Macération par méthanol</p>		
<p><i>Asphodelus tenuifolius</i> (les tiges) Soxhlet par méthanol</p>		
<p><i>Asphodelus tenuifolius</i> (les racines) Soxhlet par méthanol</p>		

Figure 25: Résultats de l'activité anti-bactérienne des deux plantes étudié
Asphodelus microcarpus et *Asphodelustenuifolius*

Conclusion

Les dernières décennies sont marquées par l'intérêt particulier porté à la mise en valeur des plantes à intérêt médicinal comme source de substances bioactives naturelles. À cet effet, dans le cadre de la valorisation des espèces du genre *Asphodelus* deux espèces ont été étudiées, à savoir *Asphodelus microcarpus* et *Asphodelus tenuifolius*. Ce travail a pour objectif l'étude de la composition phytochimique et de l'activité biologique de ces deux espèces.

L'extraction est faite par deux méthodes en utilisant trois solvants. Les résultats obtenus montrent que l'utilisation de l'extracteur soxhlet avec le solvant eau / méthanol aux proportions (30/70) (v/v) permet d'obtenir les meilleurs rendements pour les deux plantes.

L'étude phytochimique qualitative a mis en évidence la présence des flavonoïdes, des tanins, des quinones libres, des terpénoïdes et des saponosides dans les différents extraits des deux parties sous terraines et aériennes de *Asphodelus microcarpus* et de *Asphodelus tenuifolius*.

Les dosages photochimiques quantitatifs ont montré que les extraits de la partie sous terraines et aériennes de *Asphodelus microcarpus* présentent la teneur la plus élevée en polyphénols totaux (196.90 µg EAG/mg de MS et 178.31 µg EAG/mg respectivement) en comparaison avec les extraits de *Asphodelus tenuifolius* (150.91 µg EAG/mg de MS et 22.22 µg EAG/mg respectivement). La teneur des flavonoïdes et des tanins est plus élevée dans l'extrait de la partie sous terraines de *Asphodelus microcarpus* et sont respectivement de l'ordre de 49.43 µg EC/mg de MS et de µg 24.81 EQ/mg de MS.

Pour l'activité anti-oxydante, les résultats obtenus montrent que les extraits de *Asphodelus microcarpus* et *Asphodelus tenuifolius* présentent une capacité de piégeage du radical DPPH importante. Cette capacité de piégeage augmente avec l'augmentation de la concentration des extraits. À la lumière des résultats de l'activité anti-oxydante on constate que c'est l'extrait de la partie aérienne de *Asphodelus tenuifolius* qui présente la capacité anti-oxydante la plus élevée avec une IC₅₀ de 88,657 µg/ml.

L'activité antibactérienne réalisée *in vitro*, à l'aide de la méthode de diffusion sur milieu solide, montre que les extraits de la partie sous terraines et aériennes de *Asphodelus microcarpus* et *Asphodelus tenuifolius* présentent une activité anti-bactérienne modérée à l'encontre de *S.aureus* (Gram⁺), mais aucune activité n'a été enregistrée contre la bactérie *E.Coli* (Gram⁻).

Conclusion

Les résultats de ce travail soulignent l'importance des espèces d'*Asphodelus* étudiées, (*Asphodelus microcarpus* et *Asphodelus tenuifolius*). Ces deux plantes sont des sources naturelles des composés phénoliques à pouvoir antioxydant important. À cet effet, il est souhaitable de compléter le présent travail par :

- Le dosage des autres composés phénoliques tels que les acides phénoliques, les Quinones libres;
- L'utilisation d'autres méthodes pour l'étude de l'activité antioxydante telle que les méthodes électrochimiques;
- L'étude d'autres activités biologiques telles que l'activité antifongique et anti-inflammatoire ;
- L'isolement et l'identification de la ou les molécule (s) bioactive (s) responsables de l'activité antioxydantes par des techniques chromatographiques et spectrales ;
- Des études *in vivo* seront souhaitables pour déterminer les tissus et organes cibles par les extraits *Asphodelus microcarpus* et *Asphodelus tenuifolius*, et rechercher leurs mécanismes d'action au niveau tissulaire et moléculaire.

Annexes

Annexes

Annexes I : Matériels utilisés

Milieu de culture	Appareillage	Verreries et autres	Réactifs
<ul style="list-style-type: none"> • Gélose nutritive • Gélose mac conkey • Chapman 	<ul style="list-style-type: none"> • Soxhlet • Agitateur magnétique • Autoclave • Bec benzène • Etuve • spectrophotomètre • Balance de précision • Chauffe ballon lyophilisateur • Brouilleur électrique • Vortex • La haute 	<ul style="list-style-type: none"> • Pipettes graduées • Becher • Boites de pétrie • Tube en verres • Eprouvette • Flacons • Pipette pasteur • Ance de platine • Pince stérile • Coteaux • Micro pipettes • Disques absorbants • Papier filtre • Portoir • cuve 	<ul style="list-style-type: none"> • Ethanol à 70% • Méthanol à 70% • Eau distillé • Eau bi-distillé • Eau physiologique • Chlorure d'aluminium à 3% • FeCl₃ à 1% • NaOH à 1% • Acide sulfurique • Chloroforme • Réactif de folin-ciocalteau • Carbonate de sodium à 75% • Vanilline à 4% • HCl à 37 % • Chlorure d'aluminium AlCl₃ à 2% • DPPH

Annexes

Annexes II:

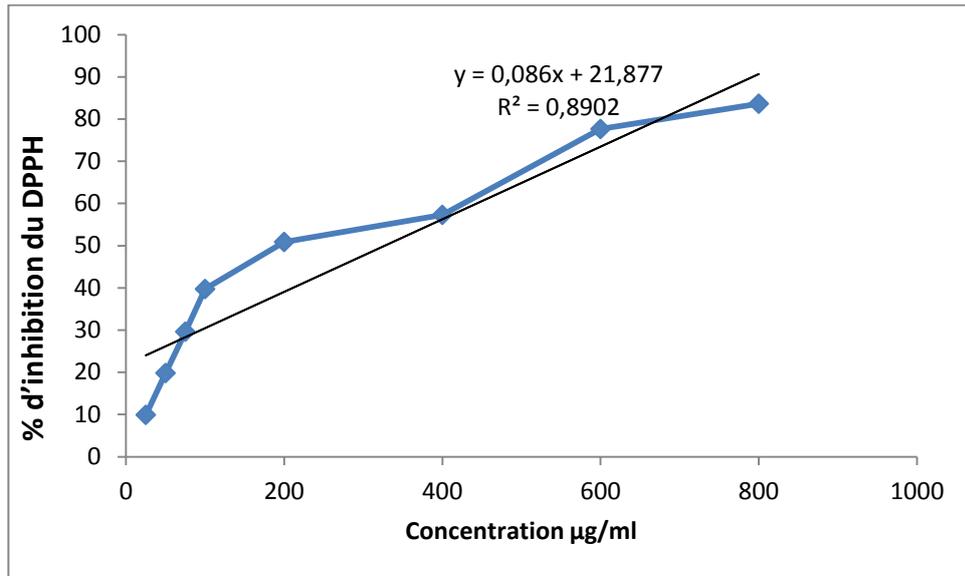


Figure 1: Représentation des régressions linéaires des % d'inhibition du DPPH pour l'extrait éthanolique par soxhlet de la partie sous terrainne d' *Asphodelus microcarpus*

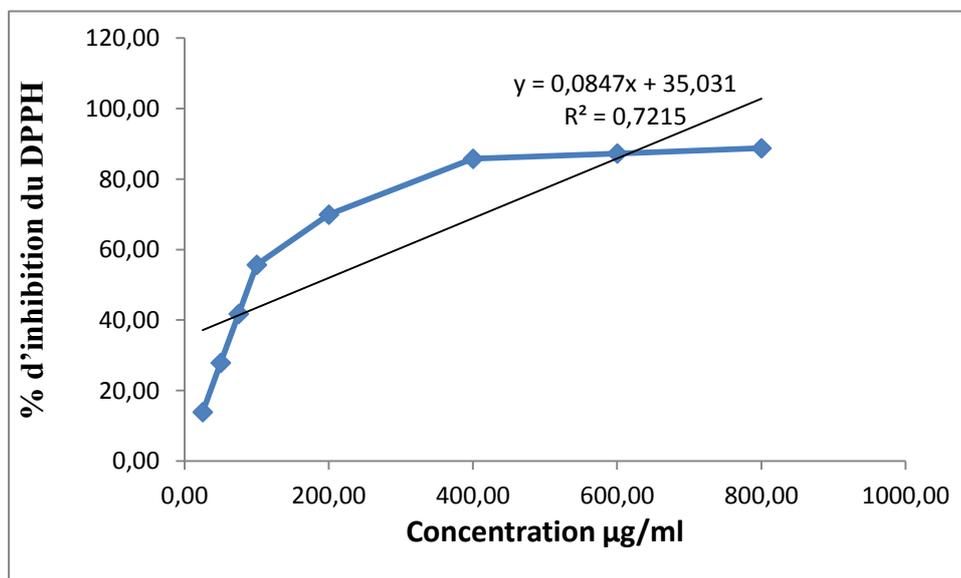


Figure 2: Représentation des régressions linéaires des % d'inhibition du DPPH pour l'extrait éthanolique par soxhlet de la partie aérienne d' *Asphodelus microcarpus*.

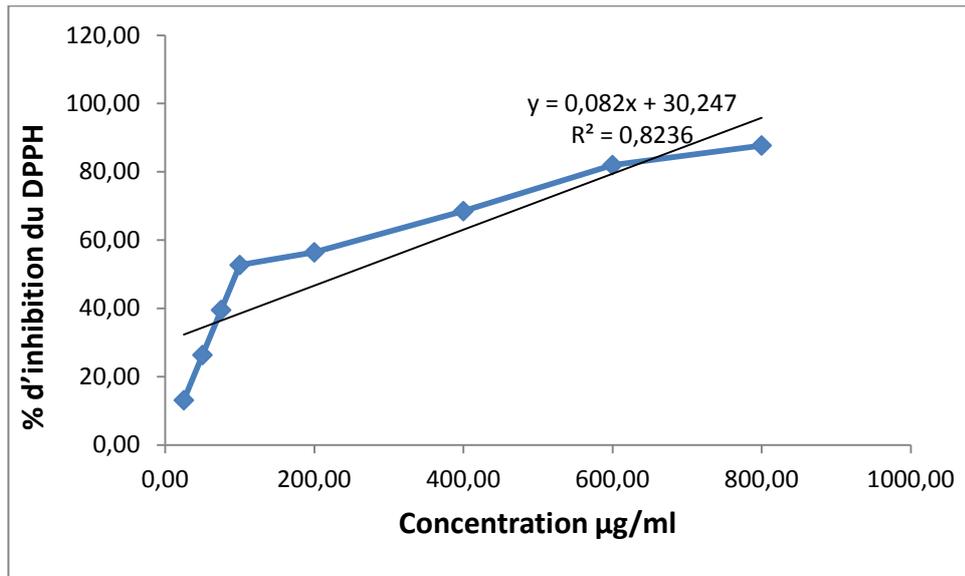


Figure 3: Représentation des régressions linéaires des % d'inhibition du DPPH pour l'extrait éthanolique par soxhlet de la partie sous terrain de *Asphodelus tenuifolius*.

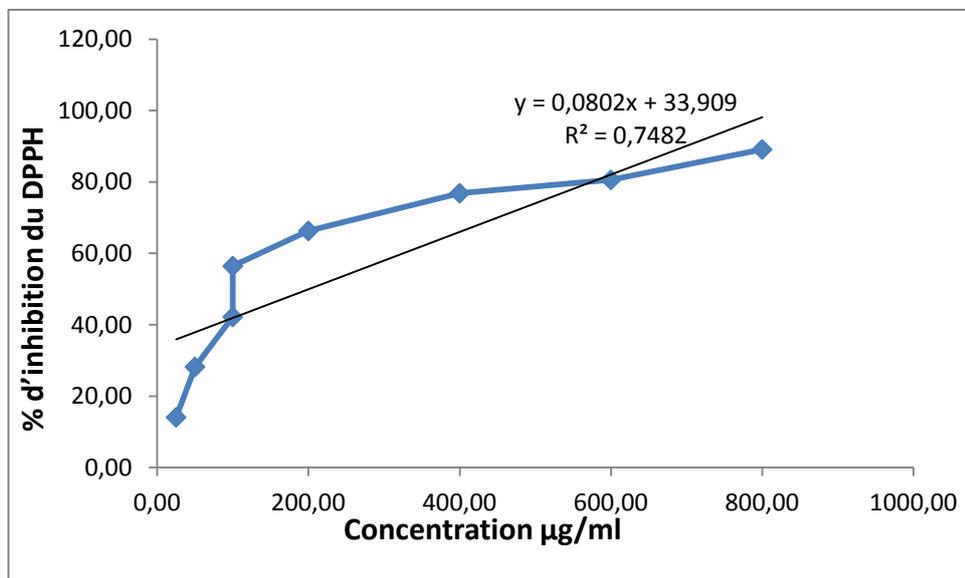


Figure 4 : Représentation des régressions linéaires des % d'inhibition du DPPH pour l'extrait éthanolique par soxhlet de la partie aérienne de *Asphodelus tenuifolius*

Résumé

L'*Asphodelus* est une plante utilisée depuis l'antiquité en médecine traditionnelle et il est reconnu par ses vertus thérapeutiques. Dans ce travail deux plantes de genre *Asphodelus* à savoir *Asphodeluse microcarpuse* et *Asphodelus tenuifolius* ont été étudiées.

Notre recherche porte en premier lieu sur une étude phytochimique des extraits obtenus selon deux méthodes d'extraction la macération à froid et l'extraction par Soxhlet, en utilisant différents solvants eau/méthanol (30/70) (v/v), eau/éthanol (30/70) (v/v) et l'eau bi-distillée, et en deuxième lieu sur l'évaluation de leurs activités anti-oxydante et anti microbienne.

L'examen phytochimique qualitatif réalisé sur la partie sous terrain et la partie aérienne d'*Asphodeluse microcarpuse* et d'*Asphodelus tenuifolius* a montré la présence des flavonoïdes, des tanins, des terpénoïdes, de quinones libre et des saponosides dans les plantes étudiées.

L'analyse quantitative des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins, montre que les extraits méthanolique obtenus par l'extracteur soxhlet sont les plus riches en composés phénoliques par rapport aux autres extraits. Les résultats obtenus montrent aussi des teneurs importantes en polyphénols totaux dans les deux plantes. La plus grande quantité des polyphénols totaux a été détectée dans *Asphodelus microcarpus* avec 196,90 µg EAG/mg de MS et 178,31 µg EAG/mg de MS pour la partie sous terrain et aérienne respectivement. La teneur des flavonoïdes et des tanins est plus importante dans *Asphodelus tenuifolius*.

L'étude de l'activité antioxydante *in vitro* de ces extraits par le piégeage du radical libre DPPH, montre que l'extrait de la partie aérienne d'*Asphodelus tenuifolius* présente la capacité la plus élevée de piégeage du radical libre DPPH avec une IC₅₀ de 88,8 µg/ml. Et l'extrait de la partie sous terrain d'*Asphodelus microcarpus* présente la capacité la plus faible avec une IC₅₀ de 178,859 µg/ml.

Les bactéries *staphylococcus aureus* (Gram+) et *Escherichia coli* (Gram -) ont été sélectionnés pour l'évaluation de l'activité antibactérienne. Les résultats obtenus montrent que les extraits d'*Asphodelus microcarpus* et d'*Asphodelus tenuifolius* semblent avoir une action inhibitrice légère sur la croissance du *Staphylococcus aureus*.

Les mots clé : *Asphodelus microcarpus*, *Asphodelus tenuifolius*, étude phytochimique, activité antioxydante, activité antimicrobienne.

Abstract

Asphodelus is a plant used since ancient times in a traditional medicine and is recognized for its therapeutic virtues. In this work two plants of the genus *Asphodelus* namely *Asphodelus microcarpus* and *Asphodelus tenuifolius* were studied.

Our research focuses firstly on a phytochemical study of the extracts obtained using two methods of extraction cold maceration and Soxhlet extraction using different solvents. water / methanol (30/70) (v/v) , water / Ethanol (30/70) (v / v) and bi-distilled water, and secondly on the evaluation of their antioxidant and anti-microbial activities.

The qualitative phytochemical examination carried out on both underground and aerial parts of *Asphodelus microcarpus* and *Asphodelus tenuifolius* showed the presence of flavonoids, tannins, terpenoids, free quinones and saponosides in the studied plants.

Quantitative analysis of polyphenols, flavonoids and tannins showed that the methanol extracts obtained by the soxhlet extractor are the richest in phenolic compounds compared to the other extracts. The obtained results have shown high levels of total polyphenols in both plants. The greatest amount of total polyphenols was detected in *Asphodelus microcarpus* with 196, 90 µg EAG / mg DM and 178.31 µg EAG / mg DM for both underground and aerial parts respectively. The content of flavonoids and tannins was greater in *Asphodelus tenuifolius*.

The study of the antioxidant activity in vitro of these extracts by trapping the free radical DPPH showed that the extract of the aerial part of *Asphodelus tenuifolius* exhibits the capability of trapping the free DPPH radical with an IC 50 of 88.8 µg / ml. And the extract of the underground part of *Asphodelus microcarpus* showed the lowest capacity with an IC 50 of 178.859 µg / ml.

The bacteria *staphylococcus aureus* (Gram +) and *Escherichia coli* (Gram -) were selected for the evaluation of antibacterial activity. The results obtained have shown that the extracts of *Asphodelus microcarpus* and *Asphodelus tenuifolius* appear to have a slight inhibitory action on the growth of *Staphylococcus aureus*.

Key words: *Asphodelus microcarpus*, *Asphodelus tenuifolius*, phytochemical study, antioxidant activity, antimicrobial activity.

ملخص

بروق هو النبات الذي يستخدم منذ العصور القديمة في الطب التقليدي وانه معترف به من قبل خصائصه العلاجية. في هذا العمل درست نوعين من النباتات وهي *Asphodeluse microcarpuse* وبروق نحيف الأوراق بروق.

بحثنا في المقام الأول يتعلق بدراسة الكيمياء النباتية مقتطفات حصلت عليها وفقا لطريقتي استخراج اثنين النقع البارد واستخراج سوكليت باستخدام مختلف المذيبات الماء / الميثانول (70/30) (ت / ت)، والمياه / الإيثانول (70/30) (ت / ت) / والماء المقطر المزوج، وثانيا على تقييم الأنشطة المضادة للأوكسدة ومضاد ميكروبي.

وقد أظهرت دراسة الكيمياء النباتية النوعي التي أجريت على الجزء تحت الارض والجزء الجوي لل *Asphodeluse microcarpuse* وبروق نحيف الأوراق وجود مركبات الفلافونويد والعفص، تيربينويدس، كينونات وخالية من الصابونين في النباتات المختبرة.

التحليل الكمي للمادة البوليفينول، الفلافونويد والعفص، وتبين أن مستخلص الميثانول التي حصل عليها جهاز سوكلت هي الأكثر غنية بمركبات الفينول على معانيات أخرى. تظهر النتائج أيضا مستويات عالية من إجمالي البوليفينول في كلا النباتين و أكبر كمية من إجمالي البوليفينول تم الكشف في بروق *microcapus* مع EAG 196.90 ميكروغرام / ملغ MS و EAG 178.31 ميكروغرام / ملغ لل *MS terraine* الفرعي وجزء الجوي على التوالي. محتوى من الفلافونويد والعفص أعلى في بروق نحيف الأوراق.

دراسة النشاط المضاد للأوكسدة في المختبر من هذه المقتطفات التي كتبها محاصرة من DPPH الجذور الحرة، وتبين أن مستخلص الجزء الجوي للبروق نحيف الأوراق يسلك أعلى قدرة محاصرة من DPPH الجذور الحرة مع IC50 من 88.8 ميكروغرام / مل. و خلاصة الجزء تحت الارض من بروق *microcarpus* لديه أدنى القدرات مع IC 50 من 178،859 ميكروغرام / مل.

وقد تم اختيار لتقييم النشاط المضاد للبكتيريا - والعنقودية الذهبية بكتيريا المكورات العنقودية (غرام +) والإشريكية القولونية (غرام). وتظهر النتائج أن يستخرج بروق بروق *microcarpus* و *tenuifolius* يبدو أن يكون لها تأثير كاج بشكل طفيف على نمو المكورات العنقودية الذهبية.

الكلمات الرئيسية: بروق *microcarpus*، بروق نحيف الأوراق، دراسة الكيمياء النباتية والنشاط المضادة للأوكسدة، والنشاط المضادة للميكروبات.

