

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

UNIVERSITE MOULOU D MAMMERI DE TIZI-OUZOU



Faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques

Département de biologie animale et végétale

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master en biologie

Option : Génétique et amélioration végétales

Etude Morphométrique de *Hyacinthoides aristidis* et *Prospero autumnalis*.

Extraction et caractérisation de trois classes de flavonoïdes et essai d'élaboration des caryotypes des deux espèces.

Présenté par : M. AIT MOUFFOK Malek.

M^{lle}. TAIBI Sarah.

Présidente : Mme GOUCEM K. Maitre de conférences classe B à l'U.M.M.T.O

Promotrice : Mme TALEB K. Maitre de conférences classe B à l'U.M.M.T.O

Co-promoteur: M. BAIK N. Doctorant à l'U.S.T.H.B

Examinatrice : Mlle ABDELLAOUI K. Maitre assistante chargée de cours classe A à l'U.M.M.T.O

Examineur : M. MEDJEBEUR Dj. Maitre assistant chargé de cours classe A à l'U.M.M.T.O

Promotion : 2015/2016

Remerciements

*Au terme de ce modeste travail, nous tenons à remercier **Dieu** de nous avoir mis sur la voie des études et de nous avoir donné la volonté et le courage de mener à terme ce travail.*

*Nous remercions particulièrement notre promotrice Madame **TALAB K.** Etre vos étudiants a été une chance que nous avons su saisir. Nous avons été comblés par les enseignements de qualité dont nous avons bénéficié à vos côtés. Votre disponibilité, votre rigueur et vos qualités intellectuelles forcent notre admiration. Veuillez trouver ici chère Promotrice, le témoignage de notre sincère reconnaissance.*

*Nous remercions beaucoup **Mr BAIK N.** de nous avoir ramené les échantillons et de nous avoir assistés lors des caractérisations morphologiques et l'extraction des polyphénols.*

*Nos remerciements les plus sincères s'adressent aux professeur **YAKOUB S.** responsable du Master Génétique et amélioration des plantes et du laboratoire CIV, qui nous a hébergés pendant la partie expérimentale.*

*Nos remerciements les plus sincères s'adressent aux membres du jury ; a Madame **GOUCEM K.** d'avoir accepté de présider ce jury, Mr **MEDJEBEUR DJ.** Et Mademoiselle **ABDELLAOUI K.** de nous avoir fait l'honneur d'examiner ce travail et de l'enrichir par leurs critiques constructives.*

*Nous remercions Mr **ALI SOFIANE** et **SMAIL** de notre bibliothèque central.*

*Nous tenons à remercier Madame **AMIROUCHE N.** Professeur à l'USTHB (Alger) pour son accueil dans son laboratoire éco-génétique et son aide avec les documents et les articles.*

*Nous n'oublierons pas de remercier Mademoiselle **OURARI F.** pour avoir eu la gentillesse de nous envoyer les produits que nous avons utilisés dans l'étude du caryotype de nos espèces et pour tous les conseils qu'elle nous a prodigués à distance.*

Nous remercions également toutes les personnes qui nous ont aidés dans la recherche bibliographique à la bibliothèque de la faculté biologie te central de l'USTHB, l'INA, et la bibliothèque de la faculté SNV de Blida.

*Merci à **DJAZIYA** et **WAHIBA** pour leur aide.*

Merci à tous nous enseignants.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

- ✓ *A mes très chers parents, aucune dédicace aussi parfaite et douce soit-elle, ne saurait exprimer toute ma reconnaissance et tout l'amour que je vous porte.*

Ce travail présente le fruit de votre soutien, vos sacrifices, et vos encouragements.

Que dieu vous protège et vous accorde une longue vie pleine de santé et de bonheur.

- ✓ *A mes frères et ma très chère sœur pour leurs encouragements et leurs aides.*
- ✓ *A ma nièce Maria que j'adore que dieu la garde.*
- ✓ *A tous mes amis et à tous les membres de ma famille.*

Sarah 

Résumé :

Cette étude a pour but d'évaluer les différences morphométriques entre les feuilles et les bulbes des espèces *Hyacinthacées Prospero autumnalis* et *Hyacinthoides aristidis*, provenant toutes deux de la région de Tizi Rached. L'extraction et le dosage des flavonoïdes à partir des feuilles et des bulbes ont montré que les feuilles sont plus riches en flavonoïdes que les bulbes. Les teneurs en c-glycosides sont plus importantes que celles des anthocyanes et aglycones flavonoïques chez les deux espèces considérées. L'essai élaboré dans le but de déterminer le nombre de chromosomes a révélé que *Prospero autumnalis* avec $2n = 14$ et *Hyacinthoides aristidis* $2n = 16$.

Mots clés : *Prospero autumnalis*, *Hyacinthoides aristidis*, Tizi Rached, flavonoïdes, chromosomes.

Abstract :

This study aims at estimating the morphometric differences between leaves and bulbs of two species of *Hyacinthacées Prospero autumnalis* and *Hyacinthoides aristidis*, coming from the region of Tizi Rached. The extraction and the dosage of flavonoids from leaves and bulbs showed that leaves are richer in flavonoids than bulbs. The contents of c-glycosides are most important than those of the anthocyanins and aglycones flavonoïques to both considered species. The trial developed with the aim of determining the number of chromosomes revealed that *Prospero autumnalis* with $2n = 14$ and *Hyacinthoides aristidis* $2n = 16$.

Keywords: *Prospero autumnalis*, *Hyacinthoides aristidis*, Tizi Rached, flavonoids, chromosomes.

Dédicaces

En guise de reconnaissance je dédie ce mémoire :

A mes très chers parents, pour leur dévouement, leur amour, leur soutien moral et financier durant toute ces années d'études.

Je prie ALLAH pour qu'il vous prête longue vie et bonne santé.

A ma chère sœur bien aimée et son mari ;

A mon frère adoré SALEM ;

A tous les membres de ma grande famille ;

A tous mes amis et collègues ;

A la mémoire de mon cher ami SAMIR FRAGA que DIEU l'accueillir et le garde dans son vaste paradis ;

A toutes les personnes qui m'aiment, et que j'aime ;

A toutes les personnes qui aiment le savoir.

MALEK

Figure 1 : Distribution de l'espèce <i>Hyacinthoides</i> en Afrique (site African Flowering Plants Database)	3
Figure 2 : Morphologie de <i>Hyacinthoides aristidis</i> (Coss et Rothm, 2015)	5
Figure 3 : Distribution de l'espèce <i>Hyacinthoides aristidis</i> en Afrique (Site African Flowering Plants Databas)	6
Figure 4 : Morphologie de <i>Prospero autumnalis</i> (Amirouche, 2014)	9
Figure 5 : Distribution de l'espèce <i>Prospero autumnalis</i> (L.) Speta (1998) en Afrique (site African Flowering Plants Database)	9
Figure 6 : Structure générale de flavonoïdes (Bruneton, 1999)	13
Figure 7 : Feuilles de <i>Hyacinthoides aristidis</i> séchés et coupés	16
Figure 8 : Bulbes de <i>Hyacinthoides aristidis</i> séchés et coupés	17
Figure 9 : Bulbes de <i>Prospero autumnalis</i> séchés et coupés.....	17
Figure 10 : Poudre végétale de <i>Hyacinthoides aristidis</i>	18
Figure 11 : Poudre végétale de <i>Prospero autumnalis</i>	18
Figure 12 : Insufflation toutes les 10 mn.....	19
Figure 13 : Phases d'extraction des flavonoïdes	20
Figure 14 : Extraits flavonoïques obtenus.....	20
Figure 15 : Protocole d'analyse général des flavonoïdes (Leberton, 1967)	21
Figure 16 : Rhizogenèse à partir des bulbes de <i>Hyacinthoides aristidis</i> et <i>Prospero autumnalis</i>	24
Figure 17 : Moyenne des 8 caractères des 2 populations mesurés chez <i>Prospero autumnalis</i> et <i>Hyacinthoides aristidis</i>	27
Figure 18 : Moyenne des teneurs absolues des trois classes de flavonoïdes étudiées des feuilles et des bulbes de la population1 (<i>Prospero autumnalis</i>)	28
Figure 19 : Moyenne des teneurs absolues des trois classes de flavonoïdes étudiées des feuilles et des bulbes de la population2 (<i>Hyacinthoides aristidis</i>)	29
Figure 20 : teneurs en aglycones dans les deux organes (feuilles, bulbes) de deux populations (<i>Prospero autumnalis</i> et <i>Hyacinthoides aristidis</i>)	31
Figure 21 : teneurs en anthocyanes dans les deux organes (feuilles, bulbes) de deux populations (<i>Prospero autumnalis</i> et <i>Hyacinthoides aristidis</i>)	32
Figure 22 : teneurs en c-glycosides dans les deux organes (feuilles, bulbes) de deux populations (<i>Prospero autumnalis</i> et <i>Hyacinthoides aristidis</i>)	33

Figure 23 : Différentes phases mitotiques de <i>Prospero automnalis</i> observées au microscope photonique G : 40×10 (Laboratoire de CIV, 2016).	35
Figure 24 : Différentes phases mitotiques de <i>Hyacinthoides aristidis</i> observées au microscope photonique G : 40×10 (Laboratoire de CIV, 2016)	35
Figure 25 : Caryotype de <i>prospero automnalis</i> d'après HAMOUCHE (2014).	36

Liste des tableaux

Tableau 1 : Noms des quelques espèces du genre <i>Scilla</i> ayant changé de nom.	4
Tableau 2 : Les principales classes des composés phénoliques (MACHEIX <i>et al.</i> , 2006). ...	11
Tableau 3 : Caractères morphologiques mesurés chez les deux espèces de Hyacinthacées...	17
Tableau 4 : Prétraitement par deux agents mitoclasiques.	24
Tableau 5 : Moyenne \pm écarts types de caractères des 2 populations étudiées.	26
Tableau 6 : Moyennes \pm écarts types des teneurs absolues en trois classes flavonoïdes des deux organes (feuilles et bulbes) de la population 1 <i>Prospero autumnalis</i>	28
Tableau 7 : Moyennes \pm écarts types des teneurs absolues en trois classes flavonoïdes des deux organes (feuilles et bulbes) de la population 2 <i>Hyacinthoides aristidis</i>	29
Tableau 8 : Teneurs en aglycones dans les deux organes (feuilles et bulbes) des deux populations (<i>Prospero autumnalis</i> et <i>Hyacinthoides aristidis</i>).	30
Tableau 9 : Teneurs en anthocyanes dans les deux organes (feuilles et bulbes) des deux populations (<i>Prospero autumnalis</i> et <i>Hyacinthoides aristidis</i>).	31
Tableau 10 : Teneurs en c-glycosides de deux organes (feuilles, bulbes) de deux populations.	32
Tableau 11 : Variations des teneurs en composés flavonoïques (aglycones, anthocyanes et c-glycosides) dans les deux parties de la plante (feuille, bulbe) de deux populations <i>Prospero autumnalis</i> et <i>Hyacinthoides aristidis</i>	33

Sommaire

Remerciement

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Chapitre I synthèse bibliographique

I Généralités sur les scilles.....2

I-1 Présentation de la famille de Hyacinthaceae.....2

I-1-1 les sous familles de Hyacinthaceae.....3

I-2 Le genre Hyacinthoides.....4

I-3 Présentation de genre *Hyacinthoides aristidis*.....4

I-3-1 Description botanique 5

I-3-2 Aire de répartition 6

I-3-3 Systématique 6

I-4 Le genre *Prospero*..... 7

I-4-1 Présentation de *Prospero autumnalis* (L.) Speta8

I-4-2 Description botanique9

I-4-3 Aire de répartition9

I-4-4 Systématique10

I-5 Caryosystematique.....10

II Les polyphénols 11

II-1 Les différents familles de composés phénoliques.....11

II-2 Les flavonoides..... 12

II-3 Localisation et rôle des composés phénoliques13

II-4 Propriétés physico-chimiques 13

II-5 Domaine d'application des composés phénoliques.....14

II-6 Utilisation des acides phénoliques par la plante.....15

Chapitre II Matériel et méthodes

I Matériel végétal.....16

I-1 Station d'échantillonnage 16

I-1-1 Les feuilles16

I-1-2 Les bulbes16

II Méthodes 17

II-1 Etude morphologique17

II-2 Extraction des flavonoïdes par hydrolyse acide	18
II-3 Protocole expérimental	19
II-4 Analyse quantitative	22
II-5 Essai d'élaboration des caryotypes des deux espèces.....	24

Chapitre III Résultats et discussion

IVariabilités morphologique des deux espèces <i>Prospero autumnalis</i> et <i>Hyacinthoides aristidis</i>	26
I-1 Comparaison des moyennes des différents caractères étudiés	26
II Etude comparative de la composition en flavonoïdes entre les feuilles et les bulbes.....	28
II-1 Population 1 <i>Prospero autumnalis</i>	28
II-2 Population 2 <i>Hyacinthoides aristidis</i>	29
III Etude comparative entre la population 1 et 2 (<i>Prospero autumnalis</i> et <i>Hyacinthoides aristidis</i>)	30
IV Essai de détermination des caryotypes des 2 espèces.....	35
Conclusion et perspectives	37

Références bibliographique

Annexes

Les recherches sur les bienfaits des plantes sont toujours d'actualité, avec pour conséquences de nouvelles découvertes dont les applications sont nombreuses, aussi bien en médecine et en pharmacie que dans d'autres domaines tels que l'agroalimentaire et les industries chimiques (VAN HELLEMONT, 1986).

L'Algérie est considérée comme l'un des 33 points chauds de très forte biodiversité avec le plus grand nombre de plantes endémiques. C'est un pays possédant d'importantes richesses phytogénétiques. Cette richesse est principalement localisée dans les régions telliennes, les secteurs humides et subhumides qui comportent des «hotspots» ou points chauds de biodiversité unique (VELA et BENHOUBOU, 2007 ; AMIROUCHE et MISSET, 2009). Les taxons endémiques, occupent des aires géographiques plus réduites par rapport aux autres, représentant proches sur le plan systématique et sont donc en général des espèces rares. La sauvegarde du patrimoine génétique des espèces rares, relictuelles et endémiques est devenu une nécessité face aux menaces d'une civilisation de plus en plus envahissante (FAVARGER et SILJAK-YAKOVLEV, 1986).

Depuis les nombreux remaniements concernant l'ordre des Liliales et des Asparagales, la famille des Hyacinthaceae et devenue une famille singulière est devenue un bon exemple d'étude. Actuellement, la famille des Hyacinthaceae est positionnée dans l'ordre des Asparagales par de nombreux travaux systématiques (JUDD *et al.*, 2002 ; APGIII, 2009).

Pour cet intérêt grandissant des substances naturelles bioactives, les polyphénols conservent une place de choix dans la découverte de ces nouvelles molécules thérapeutiques, et capturent l'intérêt de plusieurs recherches vue le nombre de leur propriétés biologiques indénombrables, l'activité antioxydante est l'une de ces propriétés qui fait actuellement l'objet de nombreuses études (HENNEBELLE, 2006).

Cette étude repose sur une caractérisation morphologique et une quantification des polyphénols flavoniques ainsi qu'un essai de détermination des caryotypes des deux espèces de Hyacinthaceae *Hyacinthoides aristidis* et *Prospero autumnalis*.

Le premier chapitre porte sur une étude bibliographique relative aux deux espèces (*Hyacinthoides aristidis* et *Prospero autumnalis*), ainsi qu'aux polyphénols, le deuxième concerne le matériel et les méthodes utilisées, le troisième chapitre est consacré aux résultats et discussion et enfin une conclusion et perspectives d'étude terminent notre travail.

I- Généralités sur les scilles

Les scilles "sensu lato" sont des Plantes herbacées monocotylédones vivaces à bulbe. Leur feuilles sont simples, sessiles, entières, basilaires regroupées en rosette se développant pendant ou après la floraison. La hampe florale est aphyllé portant des inflorescences de type grappe rarement cyme. Les fleurs sont hermaphrodites, actinomorphes, pédonculées avec ou sans bractées florales. Le Périanthe est dialytépale à tépales uninerviés de couleur variable (lilas, violets ou bleus) disposés en deux verticilles. L'androcée est dialystémones, diplostémones, alternitépales à insertion du filet médifixe. L'ovaire est supère constitué de trois carpelles soudés uniloculés. Le style présent stigmate trilobé. Les ovules sont anatropes à placentation axile. le fruit est une capsule subglobuleuse, loculicide. Les graines ovoïdes, albuminées à embryon droit ou courbe.

Les Scilles d'Algérie se rapportent à trois genres appartenant à la famille des Hyacinthacée, *Prospero salisb*, *Barnardia lindley* et *Hyacinthoides* (Rothm). Ces espèces sont endémiques à l'Algérie et la Tunisie. En Algérie, il semble que la zone naturelle de ces espèces est principalement la région de Kabylie à l'est d'Alger, mais il est possible de le trouver dans la partie occidentale jusqu'à Cherrhell (Hamouche 2014).

I-1 Présentation de la famille des Hyacinthaceae

Dans les flores de Maire (1958) et de Quezel et Santa (1962), les genres de la famille des Hyacinthaceae étaient regroupés dans l'ancienne famille des Liliaceae.

Actuellement, la famille des Hyacinthaceae est incluse dans la famille des Aspargaceae qui contient approximativement 70 genres et 1000 espèces et qui sont distribuées en Europe et dans la région extratropicale de l'Asie et de l'Afrique (Pfosser et Speta, 1999 ; Watson et Dallwitz, 2000).

Quelques genres transférés de la famille des Liliaceae aux Hyacinthaceae sont par exemple : *Bellevalia*, *Brimeura*, *Charybdis*, *Dipcadi*, *Drima*, *Hyacinthella*, *Hyacinthus*, *Muscari*, *Ornithogalum*, *Othocallis*, *Prospero* et *Scilla*....

La famille des Hyacinthaceae a plusieurs centres de diversité avec un grand nombre d'espèces en Afrique australe, en Méditerranée (Pfosser et Speta, 2001) et au Nord de l'Europe jusqu'au sud de l'Asie avec quelques espèces au Sud-Ouest Américain. Les taxons de cette famille sont adaptés à des climats saisonniers avec des périodes sèches et humides dans des régions tropicales et peu dans les régions forestières (figure1).



Figure 1 : Distribution de l'espèce *Hyacinthoides* en Afrique (site African Flowering Plants Database).

En Algérie, les Hyacinthaceae se développent préférentiellement dans les biotopes frais du littoral, des collines du Sahel et de l'Atlas tellien. Certaines espèces sont menacées de disparition, leur habitat subissant d'importantes dégradations dues aux activités anthropiques telles que l'urbanisation, la pollution, la déforestation et l'érosion des sols (Hamouche, 2014). Certains taxons de cette famille sont largement répartis, d'autres sont endémiques.

I-1-1 Les sous-familles des Hyacinthaceae

L'analyse du séquençage de gènes nucléaire et chloroplastiques a permis à Pfosser et Speta (1999) et Manning et al. (2004) la reconnaissance de quatre sous-familles dans la famille des Hyacinthacées ce sont : Hyacinthoideae (contient 4000 espèces), Ornithogaloideae (supérieure à 100 espèces), Urgineoideae (il ya 200-300 espèces), et Zosteraceae (Manning et al., 2009 ; Martinez-Azorin et al., 2011).

I-2 Le genre *Hyacinthoides*

Hyacinthoides est un genre de plantes herbacées vivaces, bulbeuses, blanchâtres, ovées, monocotylédones. Il appartient à la famille des Liliaceae selon la classification classique. La classification phylogénétique le place dans la famille des Hyacinthaceae (ou optionnellement dans celle des Asparagaceae).

Les espèces de ce genre ont eu plusieurs noms à travers l’histoire de la classification des espèces de Liliacées appartenant au genre *Scilla*. (Tableau 1)

Tableau1 : Représentation des noms des quelques espèces de genre *Scilla* qui ont subi des changements radicaux dans leur statut taxonomique.

<i>Ancien nom</i>	<i>Nouveau nom</i>
<i>Scilla autumnalis</i> L. Speta.	<i>Prospero autumnale</i> (L) Speta
<i>Scilla obtusifolia</i> Poir.	<i>Prospero obtusifolium</i> (Poir). Speta.
<i>Scilla artistidis</i> Coss.	<i>Hyacinthoides artistidis</i> Coss.
<i>Scilla numidica</i> Poir.	<i>Barnardia numidica</i> (Poir.) Speta.

Les espèces appartenant au genre *hyacinthoides* sont des plantes ligneuses avec des fleurs en forme de cloche de couleur bleu. Elles se distinguent des espèces appartenant au genre *scilla* par des bulbes se renouvelant chaque année et des fleurs portées par deux bractées bisanneles. Ces plantes sont rustiques, méditerranéennes, majoritairement distribuées dans la partie occidentale incluant l’Afrique du nord (Maroc, Algérie et Tunisie) (Grund mann et *al.*, 2010).

I-3 Présentation de *Hyacinthoides aristidis*

Hyacinthoides aristidis (coss.)Rothm(1944) est un parent de la jacinthe des bois et précédemment étiqueté *Scilla aristides*.

Il est originaire d’Algérie mais qui n’est pas connue à cause de sa première saison de floraison, d’habitude en Janvier mais peut s’étendre à février.

C’est un bulbe (une ampoule) nain tolérant au froid.

Il produit des pointes de fleur sur des tiges courtes avec deux feuilles vertes brillantes toutes basales, entourées inférieurement par 1-2 graines membraneuses blanchâtres très obtuses. La fleur est une nuance délicate de bleu.

I-3-1 Description botanique

Les feuilles sont engainantes n'atteignant pas 25cm de long, lancéolées aigues plus ou moins obtuses et apiculées. Elles sont plus larges au sommet. Elles sont ordinairement au nombre de 2 parfois 3 maximum, à nervation parallèles. Les fleurs hermaphrodites sont groupées en inflorescence de type cyme. La pollinisation est assurée par les insectes (entomogame). Elles sont actinomorphes, hypogynes de coloration bleue. Elles sont tepaloides à deux verticilles, dialypétales uninerviés, à nervure bleue. Les pédoncules floraux étalés-dressés, anguleux, non denticulés. La fleur est munie à la base de deux bractées blanchâtres, membraneuses un peu inégales. L'androcée est constitué de six étamines. Les filets staminaux sont insérés à la base des tépales. Les anthères de couleur bleu sont médifixes à déhiscence longitudinale introrse. Le gynécée a un seul style de couleur bleu violet. Les tiges sont florifères dressées sillonnées-côtelées. Le fruit est une capsule noire à 3 sillons, L'ovaire est supère de coloration bleue à trois loges biovulés. La graine est subglobuleuse. Un bulbe tunique blanchâtre, avec des racines fasciculées sortant à la base et au milieu du bulbe (figure2).



Figure2 : Morphologie de *Hyacinthoides aristidis* (Coss et Rothm 2015).

Habitat : *Hyacinthoides aristidis* est une plante de demi-ombre préférant les sols légèrement acides et profonds limono-sableux. Elle apprécie les chênaies-hêtraies et les haies de *Fagetalia*, et de *Quercetalia robori-petreae*.

I-3-2 Aire de répartition

Hyacinthoides se trouve en Algérie et en Tunisie. Dans la flore de Quézel et Santa (1962), Ce taxon est présent au niveau des secteurs K1 (grande Kabylie), K2 (petite Kabylie), et K3 (Numidie de Skikda à la frontière tunisienne).

Dans la flore de Maire (1958), elle se situe également en Algérie et Tunisie (figure3).

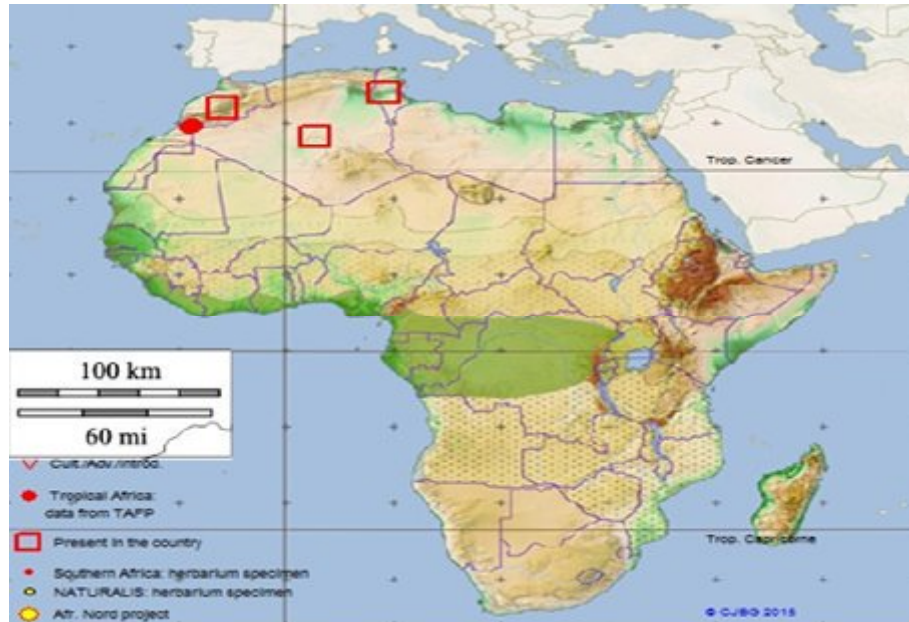


Figure3 : Distribution de l'espèce *Hyacinthoides aristidis* en Afrique (site African Flowering Plants Databas).

D'après la classification des espèces endémique l'espèce *Hyacinthoides* est considérée comme paleoendémique.

I-3-3 Systématique

Hyacinthoides aristidis est classé dans la systématique classique de Cronquist (1981) comme suit :

Règne	: Végétal
Embranchement	: Spermaphytes
Sous embranchement	: Angiospermes
Classe	: Monocotylédones
Sous/ classe	: Liliidae
Ordre	: Liliales
Famille	: Liliaceae
Sous /Famille	: Hyacinthoideae

Genre : *Hyacinthoides*
Espèce : *Hyacinthoides aristidis*

Nom binominal

Hyacinthoides aristidis (Coss).Rothm.1944

Classification phylogénétique (APGIII, 2009)

En phylogénétique *Hyacinthoides aristidis* appartient à :

Ordre : Asparagales
Famille : Hyacinthaceae

I-4 Le genre *prospero*

Prospero est une plante européenne et méditerranéenne qui appartient à la famille des Hyacinthaceae (ou Asparagaceae) autrefois inclus dans le genre *Scilla*.

Les feuilles les plus grandes des plantes adultes dépassent 1,5 mm de large, à section en croissant (face supérieure nettement concave et marges formant un angle aigu), au nombre de 4-8, émergeant peu après les pluies d'automne. Les inflorescences sont formées de 8-25 fleurs en racème. La hampe normalement dressée. La partie aérienne a longue mesure de 5-30 cm.

C'est un taxon très répandu dans le bassin méditerranéen, au moins occidental, mais remontant également vers le nord-ouest et le centre de l'Europe; ce dernier point suggère une correspondance avec les cyto-types polyploïdes, connus pour représenter exclusivement l'espèce en Europe non méditerranéenne (Vaughan et al., 1997). Toute la Corse et une grande partie de la France.

I-4-1 Présentation de *Prospero autumnalis* (L.) Speta

Prospero autumnalis (L.) Speta (syn. : *Scilla autumnalis* L.), est une plante qui appartient à la famille des Liliaceae selon la classification classique. La classification phylogénétique la place dans la famille des Hyacinthaceae (ou optionnellement dans celle des Asparagaceae).

Prospero autumnalis est une Plante vivace de petite taille mesurant 10-25 cm, à bulbe gros, ovale, blanchâtre. La tige grêle, généralement droite dès la base, rude-pubérulente dans son tiers Inférieur, 1a 2 fois plus longue que les feuilles adultes. Les feuilles sont au nombre de 5-10, nulles ou très courtes à la floraison, puis allongées, dressées, étroitement, linéaires subaiguës, un peu en gouttière, lisses de couleur vert foncé. Au mois d'Août, les fleurs deviennent violacées jusqu'au mois d'octobre. Elles sont groupées en grappe courte puis allongée, à pédicelle ascendant, sans bractées, égalant le périanthe persistant long de 4-5 mm.

Les anthères sont noirâtres. Le fruit est une petite capsule, subglobuleuse-obtuse, à 2 graines par loge. La pollinisation est de type entomogame.

Elle apprécie les pelouses sèches ou les rochers, soit en terrain montagneux ou semi-montagneux, soit sur les côtes méditerranéennes et atlantique jusqu'à 700 m d'altitude du niveau de la mer.

Prospero autumnalis (L.) Speta, est l'une des dizaines d'espèces qui ont été décrites par Speta (1982). Elle a été aussi décrite dans la flore de l'Afrique du nord et de l'Algérie (Maire 1958).

I-4-2 Description botanique

Dans cette partie nous décrivons les différents organes constituant *Prospero autumnalis*.

Les feuilles sont basales dressées, larges de 2 mm, lisses. Elles sont situées à la base de la tige portant les fleurs, poussant parfois après les fleurs. Les fleurs situées au centre de la plante de couleur rose violacé sont groupées en grappe d'abord courtes et compactes puis lâches et allongées. Elles sont non bractéolées bisexuées de type 3. Elles n'ont qu'une seule enveloppe florale: 6 tépales libres, soudés à la base, violets, obtus, 6 étamines à anthères noirâtres, en 2 verticilles, 3 carpelles soudés en un ovaire supère à 3 loges. Les pédicelles ascendants, égalent le périanthe persistant long de 4-5mm. La tige est cylindrique grêle, dressée, et droite (figure 4). Le fruit est une petite capsule, subglobuleuse-obtuse; graines à 2 loges. Il est sec, déhiscent, s'ouvrant par des fentes en deux ou plusieurs valves, ou par des dents ou par des pores, contenant plusieurs graines à mode de dissémination barochore. Un bulbe petit, blanc, perdant lentement ses tuniques extérieurs ce qui fait que le plateau s'élève dans l'intérieure du bulbe et envoie dans toutes les directions des racines qui percent ses tuniques.



Figure4 : Morphologie de *Prospero autumnalis* (Amirouche ,2014).

Habitat : *Prospero autumnalis* pousse librement dans la nature sur des pelouses basophiles méso méditerranéennes, méso xérophiles.

I-4-3 Aire de répartition

Prospero autumnalis est distribué de l'Europe occidentale et la Méditerranée, Asie occidentale à Afrique. (L'abbé Coste ,2011) (figure5).

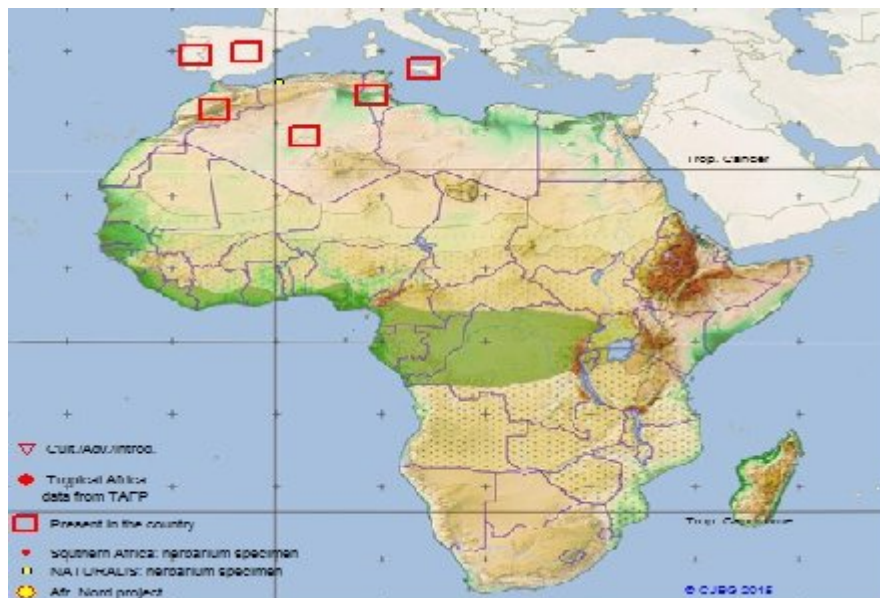


Figure5 : Distribution de l'espèce *Prospero autumnalis* (L.) Speta (1998) en Afrique (site African Flowering Plants Database).

I-4-4 Systématique

Prospero autumnalis est classé dans la systématique classique selon Cronquist (1981) comme suit :

Règne	: Végétal
Embranchement	: Spermaphytes
Sous embranchement	: Angiospermes
Classe	: Monocotylédones
Sous/ classe	: Liliidae
Ordre	: Liliales
Famille	: Liliaceae
Sous /Famille	: Hyacinthoideae
Genre	: <i>Prospero</i>
Espèce	: <i>Prospero autumnalis</i>

Nom binominal

Prospero autumnalis

(L.) Speta, 1982

Classification phylogénétique (APGIII, 2009)

En phylogénétique appartient à :

Ordre	: Asparagales
Famille	: Asparagaceae

I-5 Caryosystématique

Les Hyacinthaceae sont variables caryologiquement (Pfosser et Speta, 1999). Le dénombrement chromosomique de cette famille présente un complément chromosomique extrêmement variable avec un nombre de base $x=4, 5, 6,7$ et 8 avec plusieurs niveaux de ploïdie ($2n= 8, 10, 12, 14, 16, 26, 28, 42, 56, 70$) qui sont signalés dans diverses populations du bassin méditerranéen. Pour la sous-famille des Hyacinthoideae le nombre ancestral de base est de $x=9$ (Brullo *et al.*, 2009).

II Les polyphénols

Les composés phénoliques (CP), sont des molécules du métabolisme secondaire spécifiques du règne végétal.

Cette appellation générique désigne un vaste ensemble de substances aux structures variées qu'il est difficile de définir simplement (Bruneton, 1999).

A l'heure actuel, plus de 8000 molécules ont été isolées et identifiées (Tao et Lambert, 2014).

Ils ont tous en commun la présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles qui peuvent être libres ou engagées (Roberds, 2003 ; Hennebelle *et al.*, 2004), avec ou non d'autres fonction alcoolique (OH), carboxylique (COOH),...).

II-1 LES Différentes familles de composés phénoliques

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en une dizaine de classes (Harborne, 1990 ; Macheix *et al.*, 2006) qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C₆ à des formes très polymérisées), ensuite par le degré de modifications de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation...) enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, autres molécules secondaires pouvant être ou non des composés) (Macheix *et al.*, 2006).

Selon Harborne (1993), les composés phénoliques se répartissent dans différentes familles : anthocyanes, coumarines, lignines, flavonoïdes, tanins, quinones, acides phénols, xanthonnes. Ce sont des monomères, des polymères ou des complexes dont la masse moléculaire peut atteindre 9000.

Dans le tableau 2 sont citées les principales classes des composés phénoliques.

Tableau2 : Les principales classes des composés phénoliques (Macheix *et al.*, 2006).

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine (exemples)
C ₆	Phénol simple	Catéchol	Nombreuses espèces
C ₆ -C ₁	Acides Hydroxybenzoïques	p-hydroxybenzoïque	Epices, fraise
C ₆ -C ₃	Acides	Acide caféique	Pomme de terre

	Hydroxycinnamiques Coummarines	Acide férulique. Scopolétine	Pomme Citruc
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones	Juglone	Noix
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes	Resvératrol	Vigne
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes <ul style="list-style-type: none"> • Flavonols • Anthocyanes • Flavanols • Flavanones Isoflavonoïdes	Kaempférol, quercétine Cyanidine, pélarгонidine Catéchine, épicatéchine Naringénine Daidzéine	Fruits, légumes, Fleurs Fleurs, fruits rouges Pomme, raisin Citrus Soja, pois
(C ₆ -C ₂) ₂	Lignanes	Pinorésinol	Pin
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines		Bois, noyau des fruits
(C ₁₅)	Tannins		Raisin rouge, kaki

II-2 Les Flavonoïdes

Selon la figure 6 les flavonoïdes sont formés d'un squelette à 15 atomes de carbones (C₆.C₃.C₆) ; correspond à la structure du diphenyle propane (Santos-Buelga et Scalbert, 2000). Il comprend à lui seul plus de 6000 molécules regroupées en sous classes (Ribereau-Gayon, 1968 ; Macheix *et al.*, 2006).

Les flavonoïdes sont des pigments quasiment universels des végétaux. Ce sont des substances généralement colorées très répandues chez les végétaux. On les trouve dissoutes dans les vacuoles à l'état d'hétérosides ou comme des constituants de plastes particuliers, des chromoplaste. Presque toujours hydrosolubles. Ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Tel est les cas des flavonoides jaunes (chalcones, flavanols Jaunes), des anthocyanosides rouges, bleus ou violets.

Il reste des milliers d'autres composés à découvrir puisque le squelette des flavonoïdes peut être substitué par différents groupements hydroxy, méthoxy, méthyl, benzyl et isoprényl (Becheer, 2003).

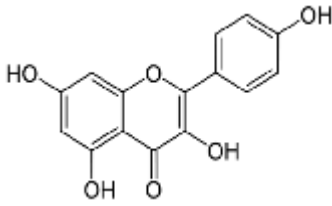


Figure 6 : Structure générale des flavonoïdes (Bruneton, 1999).

II-3 Localisation et rôle des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont présents dans les vacuoles des cellules, participent aux réactions de défense face à différents stress biotiques ou abiotiques (pathogènes, rayonnements UV....) et contribuent à la qualité organoleptique des aliments issu des végétaux (couleur, astringence, arôme, amertume). Leur répartition tant qualitative que quantitative dans la plante varie selon les espèces, les organes, les tissus ou encore les différents stades de développement (Robards *et al.*, 1999 ; Gresele *et al.*, 2011).

Se sont des composés très hétérogènes tant par leur composition que par leur structure. Pendant longtemps, ces composés ont été considérés comme secondaires et métaboliquement inactifs, ils ne suscitaient donc que peu d'intérêt. A l'heure actuelle, cette opinion a changé, du fait de nombreuses recherches qui ont largement montrées que ces composés ne sont pas inertes et contribuent efficacement dans la biosynthèse de divers métabolites de l'organisme.

Chez les végétaux, ils sont soumis à d'importantes variations quantitatives et qualitatives, ce qui témoigne d'une dynamique biochimique incontestable. Ils interviennent dans des processus vitaux les plus divers. D'où l'importance croissante des études consacrées à ces composés (Moulti-Mati et Kebbab, 2014).

II-4 Propriétés physico-chimiques

*Les propriétés physiques

Les polyphénols sont solubles dans les solvants organiques polaires, par contre leurs formes hétérosidiques sont solubles dans l'eau (Bruneton, 1993).

***Les propriétés chimiques**

Tous les composés phénoliques sont instables et sont facilement oxydables, surtout en milieu alcalin (Bruneton, 1993).

Les propriétés chimiques des phénols sont dues : d'une part aux propriétés propres au groupement OH qui sont affectées par la présence d'un cycle benzénique, d'autre part aux propriétés de ce cycle qui sont elles même influencées par la présence d'un ou de plusieurs groupements OH.

L'étude des phénols implique donc l'étude de l'influence mutuelle de la fonction phénol et du cycle benzénique (Ribereau-Gayon, 1968).

II-5 Domaines d'application des composées phénoliques

***Application pharmacologique**

Les composés phénoliques sont souvent anti-inflammatoires. Ils peuvent être anti-allergiques (Bruneton, 1993).

Les flavonoïdes ont une propriété «vitaminique p» potentiellement veino actifs ; ils diminuent la perméabilité des capillaires sanguins et renforcent leur résistance (Bruneton, 1993). Les flavonoïdes ont aussi un effet anti-hémorragique dans le scorbut et un effet anti-spasmodique (Delaveau, 1988).

Selon Perrin (1992), les polyphénols contenus dans les fruits et les légumes réduiraient le risque de certains cancers, ils assurent aussi une protection contre l'athérosclérose.

***Application agro-alimentaire**

La vanilline, abondamment utilisée dans l'industrie agro-alimentaire à la place de la vanille et des extraits de vanille, est actuellement synthétisée à partir des phénols, elle peut aussi être obtenue à partir des lignines matière première abondante et peut coûteuse (Bruneton, 1993).

La grande oxydabilité de certains phénols permet de les utiliser comme anti-oxydant, pour protéger l'oxydation des huiles et des graisses (Ribereau-Gayon, 1968).

***Application en chimiotaxonomie**

Les caractères morphologiques ne sont pas les seuls à être pris en compte pour la détermination et la classification des végétaux. Les caractères chimiques sont également utilisés depuis longtemps pour la classification des espèces végétale. Mais cette chimiotaxonomie ne s'est réellement développée que depuis les progrès de la biochimie

végétale. Parmi les marqueurs utilisés nous pouvons citer les composés phénoliques (Ribereau Gayon, 19868).

Selon Ait Aneur (1999), les flavonoïdes sont de bons marqueurs taxonomiques. Grace à leur bonne stabilité ils constituent des caractères héréditaires dotés d'une diversité structurale très forte (double liaison, substituant variés, etc.).

Ils sont non seulement des marqueurs qui discriminent les différents groupes de végétaux mais aussi un outil d'interprétation des rapports évolutifs entre ces groupes (Chehrit, 1995).

II-6 Utilisations des acides phénoliques par la plante

Les composés phénoliques sont utilisés par la plante comme moyen de défense contre les agressions pathogènes :

- Les acides phénols sont anti-bactériens et antifongique, en particulier à l'égard des organismes phytopathogènes. Parmi ces acides, les dérivés de l'acide caféique sont des précurseurs de tanins qui en s'oxydant peuvent former des quinones fortement fongitoxiques (Bruneton, 1993).
- Les lignines peuvent renforcer la paroi cellulaire lors de l'infection. Elles réduisent aussi la quantité d'eau pénétrant à travers les tissus conducteurs de la sève brute (xylème et bois) en les rendant plus résistant aux attaques microbiennes (Cambel, 1993).
- Les flavonoïdes jouent un rôle dans la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement ultraviolet (Bruneton, 1993 ; Richter, 1993).

I Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est constitué de feuilles et de bulbes de deux populations de scille d'automne qui proviennent de la région de Kabylie.

I-1 Station d'échantillonnage

L'échantillonnage de *Prospero autumnalis* et *Hyacinthoides aristides* a été effectué en automne dans un verger d'Olivier (*Olea europea*) où les plantes étaient en floraison, sous un bioclimat Subhumide. La zone de prélèvement est située à 300 m d'altitude environ dans la région de Tizi-Rached

I-1-1 Les feuilles

Après échantillonnage les feuilles ont été séchées à l'ombre et à l'abri de l'humidité et sont stockées soigneusement.

Elles sont ensuite coupées et broyées à l'aide d'un broyeur électrique à couteau, afin d'obtenir une poudre végétale, qui sera utilisée pour l'extraction des différents composés phénoliques (figure 7).



Figure 7 : Feuilles de *Hyacinthoides aristidis* séchées et coupées.

I-1-2 Les bulbes

Les bulbes récoltés ont été d'abord débarrassés de leurs pellicules. Après séchage à une température ambiante les bulbes sont coupés et broyés (Figure 8 et 9). La poudre obtenue servira à la préparation des extraits.



Figure8 : Bulbes de *Hyacinthoide aristidis* séchés et coupés.



Figure9: Bulbes de *Prospero autumnalis* séchés et coupés.

II Méthodes

II-1 Etude morphologique

Un caractère taxonomique peut être déterminé morphologiquement pour classer les espèces végétales. L'analyse de la variabilité morphologique permet de viser l'impact des différents facteurs sur la stabilité de ces caractères. L'étude morphologique des deux populations est effectuée par les mesures morphométriques des caractères de l'appareil végétatif (feuilles et bulbes) et des caractères de l'appareil reproducteur (Fleur) à l'aide de papier millimétré (Tableau 3).

Tableau 3 : Caractères morphologiques mesurés chez les deux espèces de Hyacinthacées.

Symboles	Caractères
LOF	Longueur de la feuille
LAF	Largeur de la feuille
NF	Nombre de feuilles
DB	Diamètre du bulbe

LPN	Longueur de la hampe florale
LIF	Longueur de l'inflorescence
LPF	Longueur du pédoncule floral
NFL	Nombre de fleurs

- **Test statistique :** Les résultats obtenus sont soumis à la comparaison de moyennes par le test de student à $p=0.05$ (Tableau5).

II-2 Extraction des flavonoïdes par hydrolyse acide

Notre étude repose sur l'analyse biochimique de 3 classes de flavonoïdes : **les C-glycosides, les Anthocyanes et les aglycones flavoniques** qui sont extraites à partir du matériel végétal sec pulvérisé (figure 10 et 11).



Figure 10 : Poudres végétales de *Hyacinthoides aristidis*.



Figure 11 : Poudres végétales de *Prospero autumnalis*.

L'hydrolyse acide a été mise au point par Bate-Smith (1954), puis par Lebreton (1967) puis par Jay *et al.* (1975) et enfin améliorée par Laracine (1984). Cette technique est destinée à la séparation et l'extraction des flavonoïdes par hydrolyse acide à chaud de la poudre végétal (la liaison C-O-C des O-glycosyl-flavonoïdes est très fragile et se rompt à l'hydrolyse acide en libérant les aglycones ; par contre la liaison C-C des C-glycosylflavonoïdes est très résistante à ce type d'hydrolyse) et permet d'obtenir deux types de composés :

- Une fraction d'**aglycones** et d'acides phénols par l'extraction préliminaire à l'éther diéthylique.
- Une fraction de **C-glycosides** et d'**anthocyanes** récupérée par extraction au n butanol.

II.3 Protocole expérimental :

Un échantillon de 0.5g de poudre végétale est hydrolysé par 40 ml d'HCL (2N) au bain marie bouillant pendant 40min avec insufflation d'air toutes les 10min. L'oxygène permet l'oxydation des proanthocyanidines en anthocyanidines correspondantes (figure12).



Figure12 : Insufflation toutes les 10min.

A chaque extraction deux phases apparaissent, l'une supérieure dite épiphase et l'autre inférieure dit hypophase (Figure13).

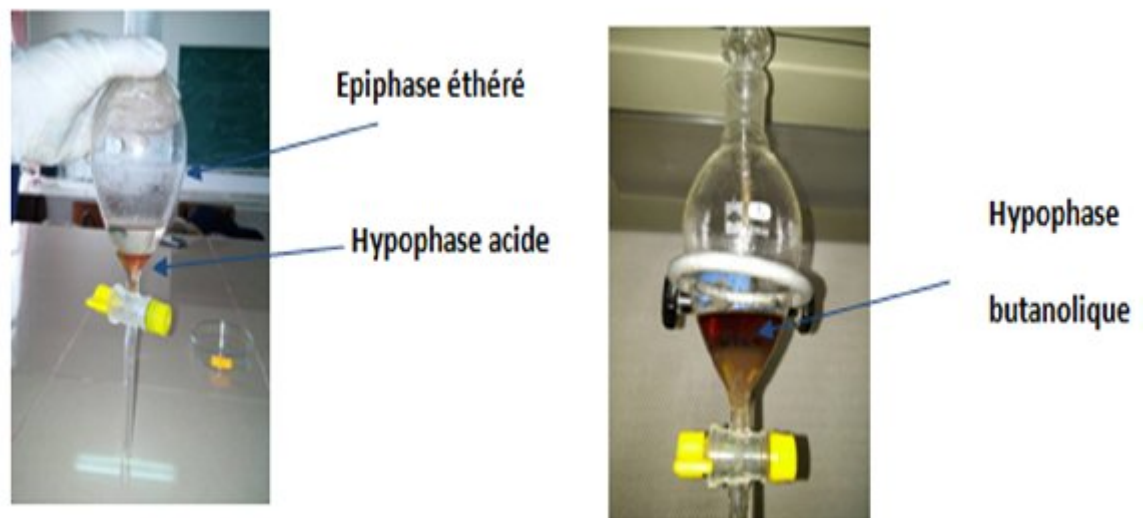


Figure13: Phases d'extraction des flavonoïdes.

Epiphase étherée

Elle est de couleur jaune verdâtre. Elle contient les aglycones (flavones et flavonols) et les acides phénols. Elle est récupérée après chacune des extractions dans un bécher et évaporée à l'aire libre. Le résidu sec est repris dans 5ml d'éthanol, puis conservé au frais avant d'être soumis à une analyse quantitative par spectrophométrie.

Hypophase acide

Elle est de couleur rougeâtre. Elle contient les anthocyanes, les C-glycosides et les oses simples. Elle est récupérée et additionnée à 35ml de n-butanol, remise dans une ampoule à décanter. Le n-butanol forme dans l'hypophase une épiphase rougeâtre butanolique qui va être récupérée dans une boîte de pétri.

Le résidu sec est repris dans 5ml de méthanol. Les extrais obtenus sont conservé par la suite au frais avant d'être soumis à une analyse quantitative par spectrophotométrie (figure14).



Figure14 : Extraits flavonoïques obtenus.

La technique d'hydrolyse acide est résumée dans la figure 15.

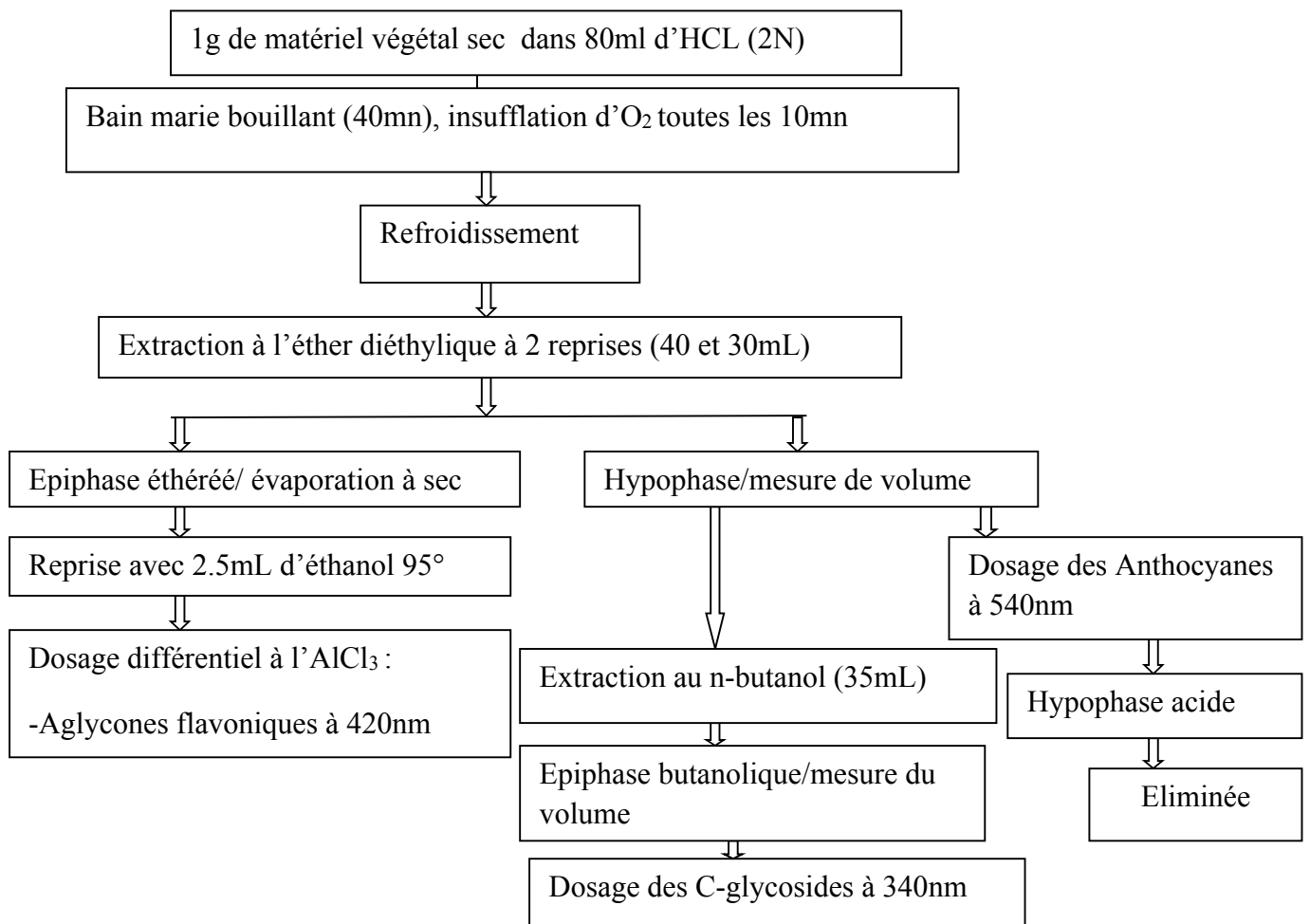


Figure15 : Protocol d'analyse général des flavonoïdes (Lebreton *et al.*, 1967).

II-4 Analyses quantitatives

L'analyse quantitative est basée sur l'utilisation de la méthode de colorimétrie qui est basée sur la propriété de certains composés qui absorbent d'avantage la lumière à des longueurs d'ondes spécifiques dans le spectrophotomètre (Plummer, 1989) ; elle permet de réaliser des dosages grâce à loi de Beer Lambert dont le principe est le suivant :

Lorsqu'une lumière d'intensité I_0 passe à travers une solution, une partie de celle-ci est absorbée par le (s) soluté (s). L'intensité I de la lumière transmise est donc inférieure à I_0 . L'absorbance de la solution est définie comme suit :

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right)$$

a) Dosage des proanthocyanes

La lecture des extraits s'établit par spectrophotomètre à 520nm juste après extraction car elle se dégrade rapidement à la lumière. La teneur absolue en anthocyanes est calculée par la formule suivante dont le coefficient correctif, est égal à 6 (Lebreton *et al.*, 1967).

$$T \text{ (mg/g)} = 5,2 \cdot 10^{-2} \cdot DO \cdot V \cdot d / p$$

DO : densité optique

V : volume de la phase méthanoïque

d : facteur de dilution

p : poids sec du matériel végétal hydrolysé

b) Dosage des C-glycosylflavones

La lecture des extraits s'établit également par spectrophotométrie à 340nm et la teneur absolue est exprimée en Orientine et calculée par la formule suivante :

$$T \text{ (mg/g)} = 2,37 \cdot 10^{-2} \cdot DO \cdot V \cdot d / p$$

DO : densité optique

V : volume de la phase la phase méthanoïque

d : facteur de dilution

p : poids sec du matériel végétal hydrolysé

c) Dosage des aglycones flavoniques

Les flavonoïdes ayant un hydroxyle (-OH) libre en position 3 et 5 réagissent avec les métaux. Le chlorure d'aluminium (AlCl_3) forme un complexe avec les flavones et/ou les flavonols. Pour déterminer la teneur en aglycones, on utilise la méthode du dosage différentiel, qui est basé sur deux dilutions :

- La 1^{ère} dilution se fait dans de l'éthanol (extrait étheré+ éthanol 95°).
- La 2^{ème} dilution se fait dans la solution d' AlCl_3 (extrait étheré+ AlCl_3 dans l'éthanol 95°).
- La solution d' AlCl_3 est préparée par le mélange de 1g de chlorure d'aluminium dans 100ml d'éthanol 95°.

A partir du résidu sec étheré repris dans de l'éthanol à 95° et d'autre part avec du chlorure d'aluminium à 1%, après réaction pendant 15min, la lecture des aglycones se fera entre 400 et 435nm au spectrophotomètre.

Concernant le dosage des Aglycones flavoniques (420nm) et des flavonols (435nm), la formule utilisée est la suivante :

$$T (\text{mg.g}^{-1}) = 1,3 \times 10^{-2} \times \Delta \text{DO} \times V \times \frac{d}{P}$$

- ΔDO : densité optique au pic différentiel égale à $\text{DO} (\text{AlCl}_3) - \text{D.O} (\text{éthanol } 95^\circ)$
- ϵ : coefficient d'absorption de la Quercétine égale à 302g
- V : volume de la solution éthanolique
- d : facteur de dilution
- p : poids sec du matériel végétal hydrolysé en g

II.5 Essai d'élaboration des caryotypes des deux espèces

Le niveau de ploïdie est établi par comptage chromosomiques au stade métaphase de la mitose des méristèmes racinaires.

Le protocole expérimental est celui est celui établi par Jahier et al. (1992). Il permet d'observer et de dénombrer les chromosomes métaphasiques. Ce protocole est décrit ci-dessous.

➤ Prétraitement

Les pointes racinaires ont été coupées directement à partir des bulbes après le prélèvement des échantillons. Les bulbes sont débarrassés des racines préexistantes puis mis à germer dans l'eau jusqu'à la poussée des racines après quelques jours (Figure16).

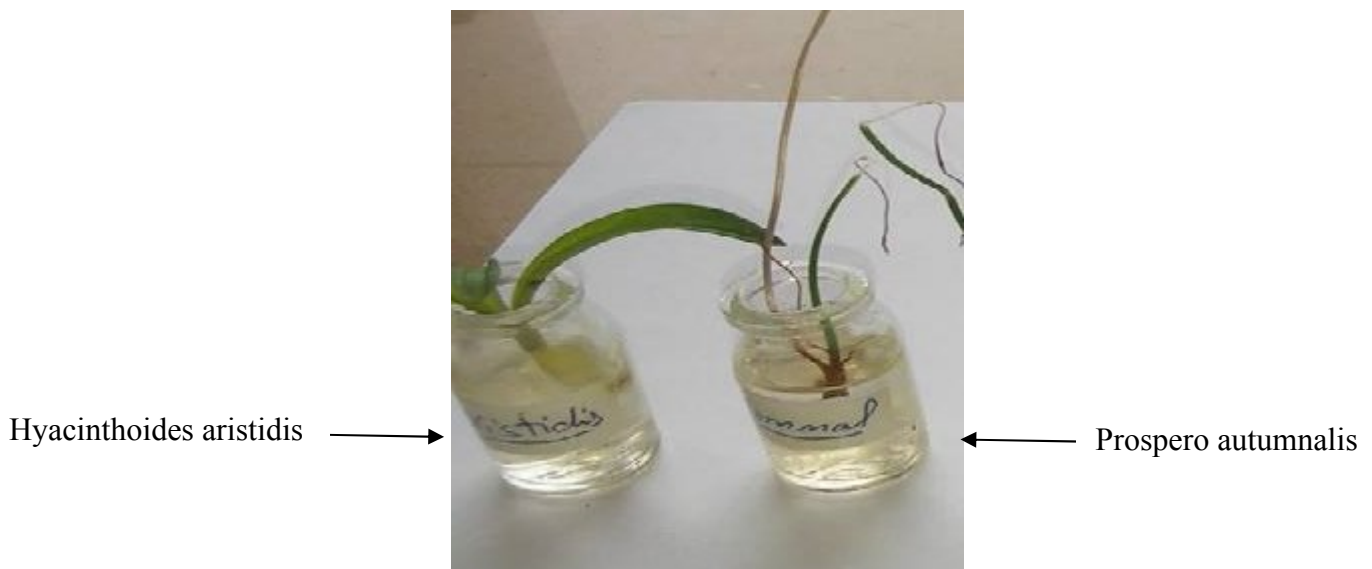


Figure16 : Rhizogenèse à partir des bulbes de *Hyacinthoides aristidis* et *Prospero autumnalis*.

Après apparition des radicules, ces dernières sont sectionnées une fois qu'elles ont atteint une longueur de 0.5 et à 1 cm. Elles sont ensuite prétraitées par immersion dans une solution de 8-hydroxyquinoline ou α -bromonaphtalène (agents mitoclasiques.), Tableau 4.

Tableau4 : Prétraitement par deux agents mitoclasiques.

Prétraitement	But	Durée
α -bromonaphtalène	-Inhiber la formation du fuseau achromatique. -bloquer les mitoses au stade métaphase.	2h à température ambiante
8-hydroxyquinoline	-bloquer les divisions cellulaires au stade métaphase.	4h à température ambiante ou 24h au froid (4°)

➤ **Rinçage**

Avec de l'eau distillée pour éliminer l'excès de l'agent mitoclasique.

➤ **Fixation**

Les racines sont ensuite fixées dans un mélange alcool-acide acétique (3 : 1 v/v) pendant 24h à 4° ou bien à température ambiante. Le fixateur détruit toute vie cellulaire. Il doit avoir une action rapide pour bloquer les divisions cellulaires et maintenir l'intégrité structurale des chromosomes.

➤ **Stockage et Conservation**

Les racines germées ont été stockées dans l'alcool 70° à froid, elles peuvent être conservés pendant une longue période.

➤ **Hydrolyse**

Après rinçage à l'eau distillée, les pointes racinaires sont plongées dans une solution d'acide chlorhydrique (HCl 1N) à 60° pendant 5mn pour subir une hydrolyse. Cette hydrolyse a pour but de ramollir les méristèmes, de rompre des liaisons glucidiques des bases puriques et de libérer les groupements aldéhydes de l'ADN. Elle facilite, par ailleurs, l'écrasement et l'étalement des cellules et des chromosomes entre lames et lamelle.

➤ **Coloration**

La coloration est réalisée selon la technique de Feulgen et Rossenbeck (1914). Les extrémités racinaires sont colorées au carmin acétique durant 1h à 3h à l'obscurité et à température ambiante. Les groupements aldéhydes libérés par l'hydrolyse, mis en présence du carmin acétique, donnent une couleur rose aux chromosomes.

➤ **Montage et observation**

Après rinçage à l'eau (pour éliminer l'excès du colorant), les extrémités racinaires colorées en rouge vif, sont montées entre lames et lamelles, dans une goutte de carmin acétique ou bien dans l'acide acétique à 45% pour augmenter le contraste entre les chromosomes et le cytoplasme. Ensuite nous réalisons des squashes qui consistent à écraser les préparations à l'aide du manche d'une aiguille lancéolée.

Les observations sont faites au microscope photonique au grossissement 40×10. (Les meilleures préparations sont celles qui présentent des chromosomes bien individualisés).

I Variabilité morphologique des deux espèces *Prospero autumnalis* et *Hyacinthoides aristidis*

Les délimitations et les relations interspécifiques sont abordées à travers une étude de la variation morphologique des populations naturelles.

Les mesures de 8 caractères biométriques quantitatifs ont été effectuées sur 10 individus de chaque espèce naturelle.

La matrice de données brutes concernant les longueurs, les largeurs, le diamètre du bulbe et le nombre de fleurs sont regroupés dans les tableaux 1 et 2 (annexe1), ceci a fait l'objet de l'étude de la variabilité morphologique.

I-1 Comparaison des moyennes des différents caractères étudiés

Les différences entre les moyennes des caractères morphologiques étudiés, au sein de chacune des deux populations sont données dans le Tableau 5 et matérialisés par le graphe de la figure 17.

Tableau 5: Moyenne \pm écarts types de caractères des 2 populations étudiées.

Pop Caractères	Pop1	Pop2
LOF	4.89 \pm 1.71	6.44 \pm 1.37
LAF	0.15 \pm 0.07	0.85 \pm 0.21
NF	2.50 \pm 0.50	3.60 \pm 0.49
DB	1.39 \pm 0.23	0.92 \pm 0.35
LNP	17.79 \pm 3.08	8.38 \pm 1.79
NIF	4.81 \pm 1.94	1.23 \pm 0.76
LPF	1.08 \pm 0.30	0.40 \pm 0.14
NFL	7.70 \pm 2.87	8.40 \pm 3.93

Les mesures des 8 caractères effectués soumises au test T (test student) ont montrés que les mesures de la longueur effectuées sur les feuilles des 2 populations n'ont montré aucune différence significative à P=5%. Quant aux largeurs des feuilles, elles ont montré des différences très hautement significative à P=0.1%.

Le nombre de feuilles dénombrés dans le cas des 2 espèces de Hyacinthaceae a montré une différence très hautement significative à P=0.001.

joutons à cela des différences très hautement significative révélées entre les 2 populations concernant le diamètre des bulbes, la longueur de la hampe florale, la longueur de l'inflorescence ainsi que celle du pédoncule floral est ce à $P < 0.001$.

Le caractère nombre de fleurs chez les 2 populations n'a montré aucune différence significative à $P = 5\%$.

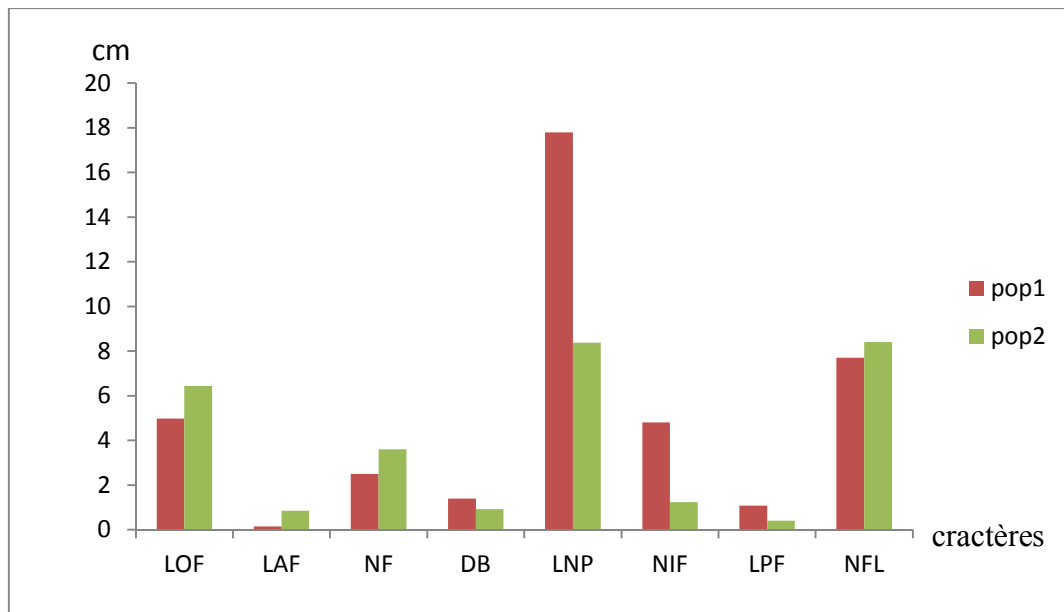


Figure17 : Moyennes des 8 caractères des 2 populations mesurés chez *Prospero autumnalis* et *Hyacinthoides aristidis*.

Les longueurs, les largeurs des feuilles et le nombre des feuilles et des fleurs sont plus important chez *Hyacinthoides aristidis* que chez *Prospero autumnalis*, alors que la longueur de la hampe florale, de l'inflorescence et du pédoncule florale ainsi que le diamètre du bulbe est plus élevé chez *Prospero autumnalis* que chez *Hyacinthoides aristidis*.

II Etude comparative de la composition en flavonoïdes entre les feuilles et les bulbes.

II-1 Population 1 *Prospero autumnalis*

Les résultats du tableau 6 nous montrent que la population de *Prospero autumnalis* présente des teneurs plus élevées en c-glycosides avec une moyenne 0.150 ± 0.024 mg/g puis les anthocyanes avec une moyenne de 0.0883 ± 0.064 mg/g puis viennent les aglycones avec une moyenne de 0.007 ± 0.0101 mg/g.

Tableau 6 : Moyennes \pm écarts types des teneurs absolues en trois classes flavonoïdes des deux organes (feuilles et bulbes) de la population 1 *Prospero autumnalis*.

Teneurs Organes	Aglycones (mg/g)	Anthocyanes (mg/g)	c-glycosides (mg/g)
Feuilles	0.015	0.134	0.168
Bulbes	0.0007	0.0427	0.133
Moyennes	0.007	0.0883	0.150
Ecarts types	0.0101	0.064	0.024

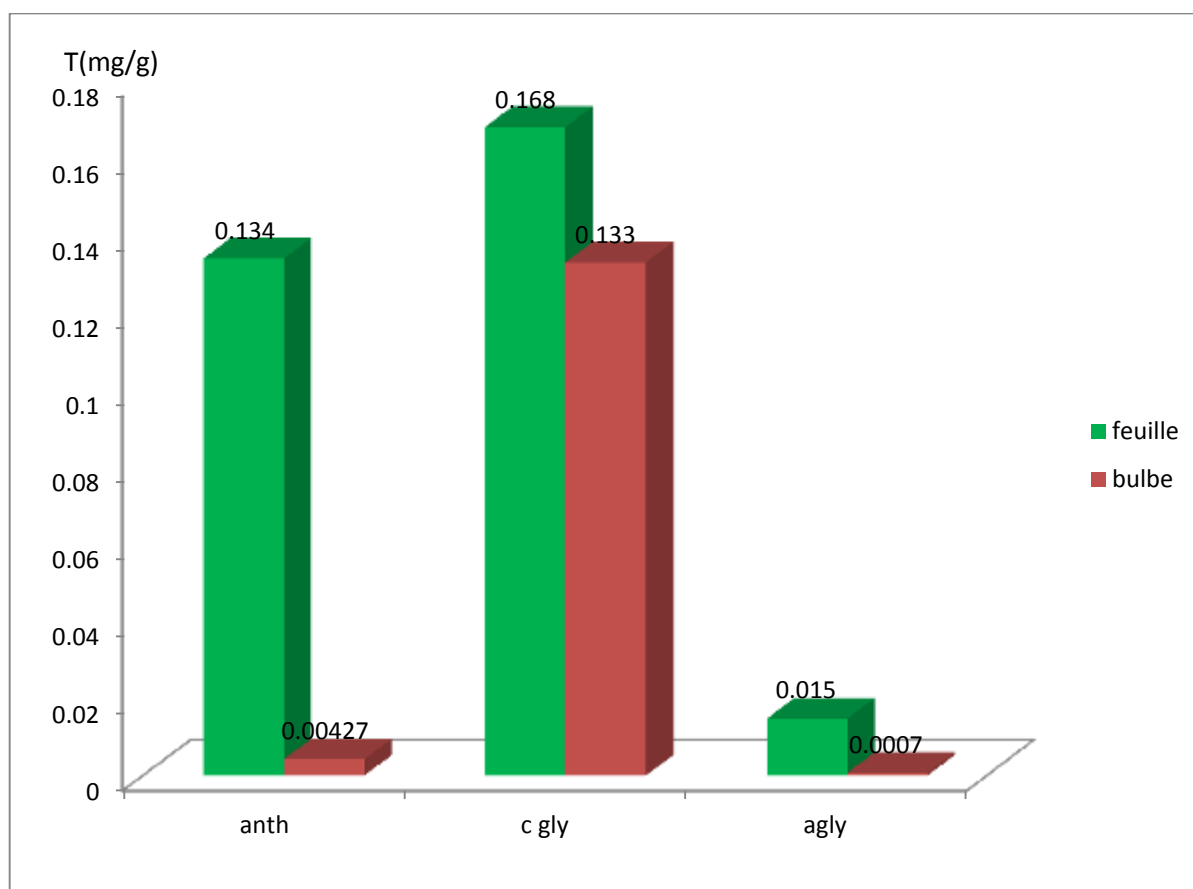


Figure 18 : Moyennes des teneurs absolues des trois classes de flavonoïdes étudiées des feuilles et des bulbes de la population 1 (*Prospero autumnalis*).

Les feuilles de *Prospero autumnalis* renferment des quantités importantes en anthocyanes (0.134mg/g) et en c-glycosides (0.168mg/g). Ces quantités sont plus importantes que celles contenues dans les bulbes avec respectivement 0.0427mg/get0.133mg/g d'anthocyanes et c-glycosides quant aux anthocyanes et aglycones, elles ont brillé par leur faible présence dans les bulbes.

II-2 Population 2 *Hyacinthoides aristidis*

La lecture des résultats du tableau 7 montre que les anthocyanes et les c-glycosides sont présentes en quantités élevées dans les feuilles avec respectivement 0.059 mg/g et 0.142mg/g alors que les aglycones ne représentent que 0.004mg/g.

Tableau7 : Moyennes± écarts types des teneurs absolues en trois classes flavonoïdes de deux organes (feuilles et bulbes) de la population 2 *hyacinthoides aristidis*.

Teneurs Organe	Aglycones (mg/g)	Anthocyanes (mg/g)	c-glycosides (mg/g)
Feuilles	0.004	0.09	0.084
Bulbes	0.004	0.053	0.034
Moyennes	0.004	0.143	0.059
Ecart types	0	0.026	0.035

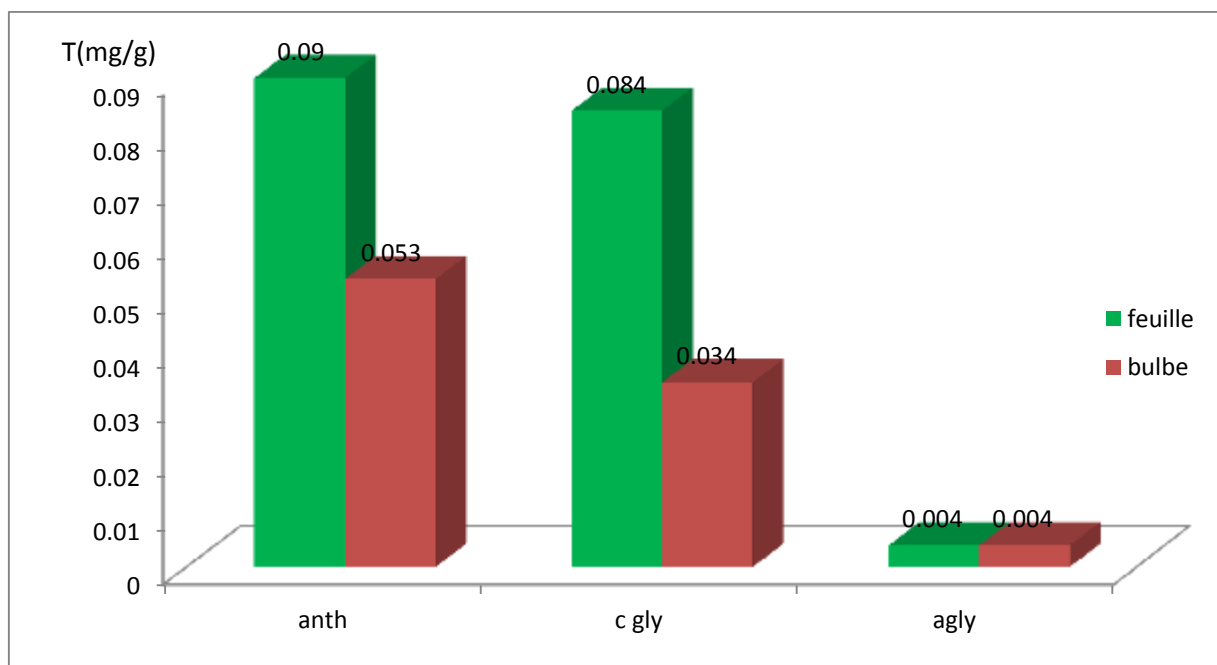


Figure19 : Moyenne des teneurs absolues des trois classes de flavonoïdes étudiés des feuilles et des bulbes de la population 2 (*Hyacinthoides aristidis*).

La figure 19 montre les résultats des teneurs absolues des substances flavonoïques de deux organes étudiés (feuilles, bulbes) au sein de la population *Hyacinthoides aristidis*, les feuilles sont les plus riches en anthocyanes et c-glycosides (0.009,0.0084 mg/g), par rapport aux bulbes (0.053,0.034mg/g), tandis que leurs teneurs en aglycones sont faible et elles sont la même que dans les feuilles et les bulbes (0.004mg/g).

III Etude comparative en composés flavonoïque entre la population 1 et 2 (*Prospero autumnalis* et *Hyacinthoides aristidis*)

Les teneurs des composés flavonoïques déterminés dans les deux organes (feuilles et bulbes) des deux populations (*Prospero autumnalis* et *Hyacinthoides aristidis*) sont regroupés dans le tableau 8.

A) Teneurs en aglycones

L'étude comparative des résultats obtenus à partir du tableau 8 nous révèle que les feuilles de *Prospero autumnalis* et *Hyacinthoides aristidis* recèlent des quantités différentes en aglycones. La population de *Prospero autumnalis* a montré une quantité plus importante avec 0.015mg/g comparativement à la population *Hyacinthoides aristidis* avec 0.004mg/g alors que les bulbes de *Prospero autumnalis* renferment moins d'aglycones (0.0007mg/g) que *Hyacinthoides aristidis* (0.004mg/g).

Tableau8 : Teneurs en aglycones dans les deux organes (feuilles et bulbes) des deux populations (*Prospero autumnalis* et *Hyacinthoides aristidis*).

Organes	Feuilles (mg/g)	Bulbes (mg/g)
Populations		
Pop1 (prospero)	0.015	0.0007
Pop2 (aristidis)	0.004	0.004
La moyenne	0.0095	0.0024
Ecart types	0.007	0.0023

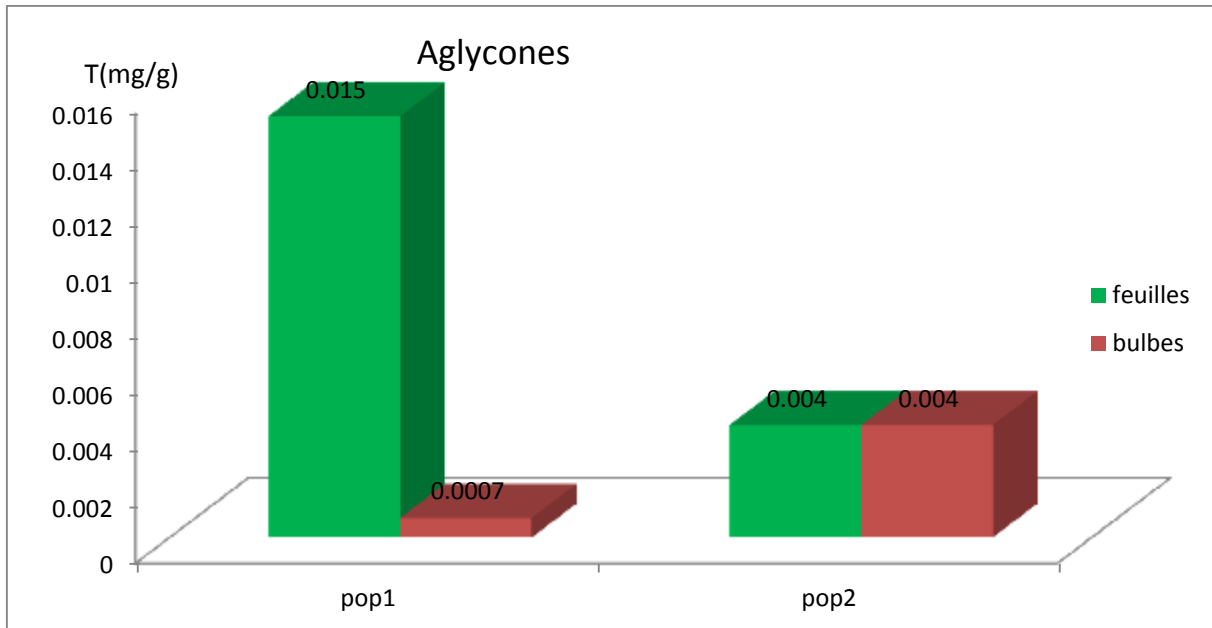


Figure20 : Teneurs en aglycones dans deux organes (feilles, bulbes) de deux populations (*Prospero autumnalis* et *Hyacinthoides aristidis*)

La figure 20 montre les teneurs absolues en aglycones dans les deux organes (feilles et bulbes) au sein de deux populations de Hyacinthacees (*Prospero autumnalis* et *Hyacinthoides aristidis*). Les feilles de la population de *Prospero autumnalis* plus riche en aglycones que celle de la population de *Hyacinthoides aristidis*. Cependant le bulbe de *Hyacinthoides aristidis* et le plus riche en aglycones que celui de *Prospero autumnalis*.

B) Teneur en anthocyanes

Le tableau 9 nous montre que les feilles de *Prospero autumnalis* et *Hyacinthoides aristidis* recèlent des quantités différentes en anthocyanes. La population de *Prospero autumnalis* a montré une quantité plus importante avec 0.134mg/g comparativement à la population *Hyacinthoides aristidis* avec 0.090mg/g alors que les bulbes de *Prospero autumnalis* renferment moins d'anthocyanes (0.0427mg/g) que *Hyacinthoides aristidis* 0.053mg/g.

Tableau9 : Teneurs en anthocyanes dans les deux organes (feilles et bulbes) de deux population (*Prospero autumnalis* et *Hyacinthoides aristidis*).

Organes	Feuille (mg/g)	Bulbe (mg/g)
Populations		
Pop1 (prospero)	0.134	0.0427
Pop2 (aristidis)	0.090	0.053
La moyenne	0.112	0.047
Ecart type	0.031	0.007

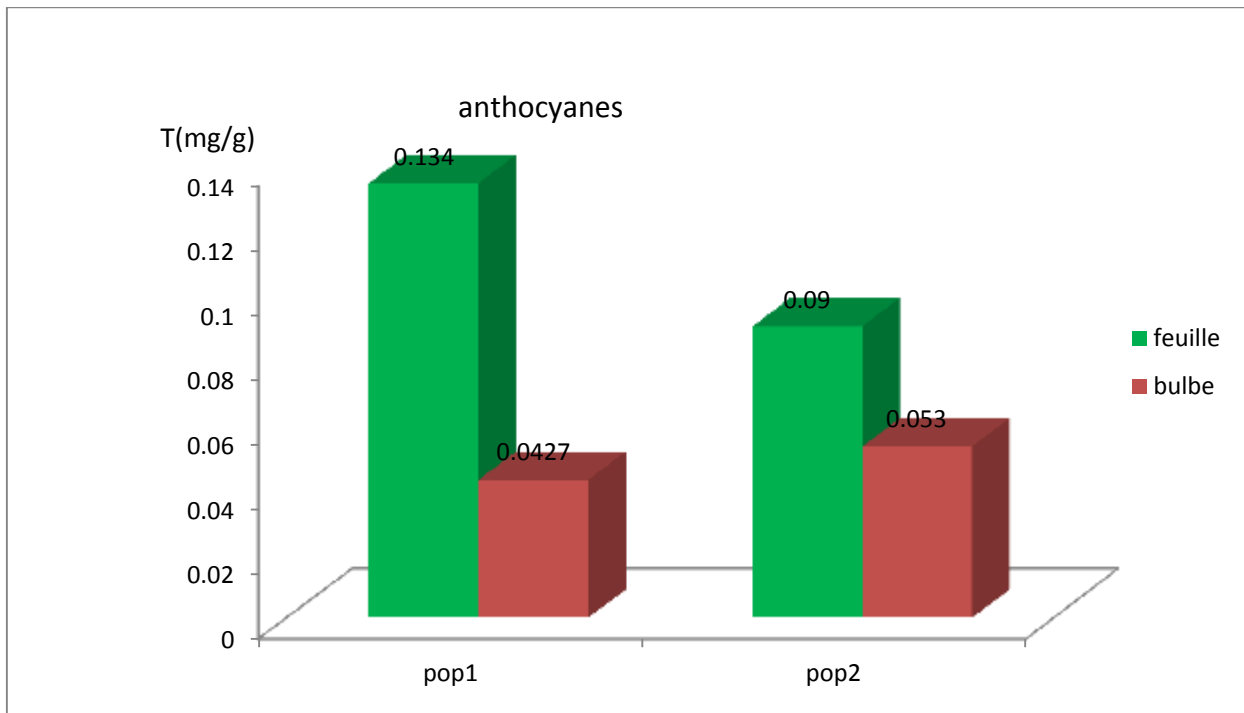


Figure21 : Teneurs en anthocyanes dans deux organes (feuilles, bulbes) de deux populations (*Prospero autumnalis* et *Hyacinthoide aristidis*).

D'après les résultats de la figure 21 nous remarquons que les teneurs en anthocyanes dans la partie feuille de la population *Prospero autumnalis* est plus élevée par rapport aux teneurs des feuilles de la population *Hyacinthoides aristidis*. Pour la partie bulbe la population de *Hyacinthoides aristidis* qui est la plus riche en anthocyanes que *Prospero autumnalis*.

C) Teneur en C-glycosides

La lecture des résultats du tableau 10 montre que les quantités des c-glycosides dans les feuilles de *Prospero autumnalis* (0.168mg/g) et plus élevée que celle de *Hyacinthoides aristidis* (0.084mg/g) ainsi que dans les bulbes de *Prospero autumnalis* renfermant une quantité de c-glycosides de (0.133mg/g) et *Hyacinthoides aristidis* (0.034mg/g).

Tableau10 : Teneurs en c-glycosides de deux organes (feuilles, bulbes) de deux populations

Organes	Feuilles (mg/g)	Bulbes (mg/g)
Populations		
Pop1 (<i>Prospero autumnalis</i>)	0.168	0.133
Pop2(<i>Hyacinthoidesaristidis</i>)	0.084	0.034
La moyenne	0.126	0.083
Ecart type	0.059	0.070

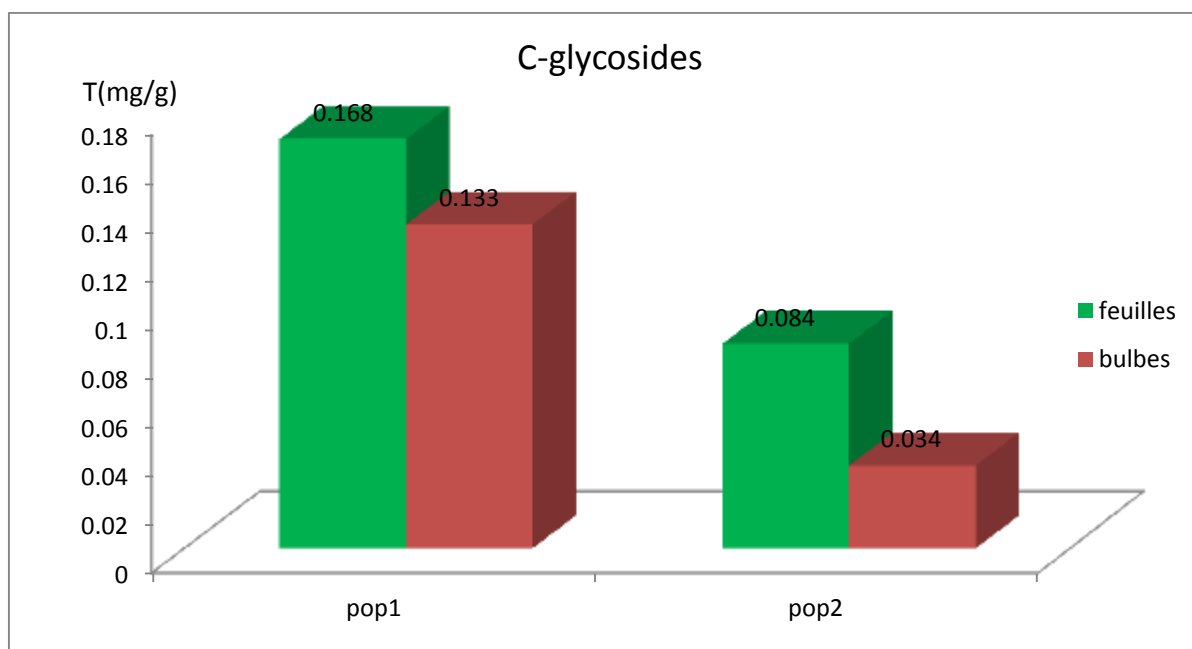


Figure22 : Teneurs en c-glycosides dans deux (feuilles, bulbes) de deux populations (*Prospero autumnalis* et *Hyacinthoides aristidis*)

La figure22 nous indique que les organes feuilles et bulbes de la population de *Prospero autumnalis* sont plus riches en c-glycosides que les organes feuilles et bulbes de la population de *Hyacinthoides aristidis*.

D) Teneurs des feuilles et bulbes en composés flavoniques

-Les résultats du tableau 11 montrent que la teneur en aglycones est plus importante que celle des anthocyanes et c-glycosides et la teneur la plus faible est celle des c-glycosides.

-Les teneurs moyennes de chaque classe flavonoïque sont :

- 0.0059 ± 0.0050 mg/g pour les aglycones dans les 2 organes.

- 0.0795 ± 0.0459 mg/g pour les anthocyanes dans les 2 organes.

- 0.1045 ± 0.0304 mg/g pour les c-glycosides dans les 2 organes.

Ces résultats nous amènent à conclure que les teneurs en c-glycosides dans toutes les parties sont proche par contre les teneurs en aglycones et en anthocyanes varient d'un organe à un autre.

Tableau11 : variations des teneurs en composés flavonoïques (aglycones, anthocyanes et c-glycosides) dans les deux parties de la plante (feuille, bulbe) de deux populations *Prospero autumnalis* et *Hyacinthoides aristidis*.

Teneurs Organes	Teneur en Aglycones (mg/g)	Teneur en Anthocyanes (mg/g)	Teneur en c-glycosides (mg/g)
Feuilles	0.0095	0.112	0.126
Bulbes	0.0024	0.047	0.083
Moyenne	0.0059	0.0795	0.1045
L'écart type	0.0050	0.0459	0.0304

L'étude quantitative des différentes classes flavonoïques au sein des deux organes (feuille et bulbe) des deux populations (*Prospero autumnalis* et *Hyacinthoides aristidis*) nous a permis d'estimer que les feuilles des deux espèces de Hyacinthacées ont une teneur relativement élevée en flavonoïdes ; la concentration de ces constituants bioactifs dépend de l'organe considéré. La concentration plus importante dans les feuilles peut être expliquée par leur exposition aérienne qui laisse supposer une agression par les UV. Les flavonoïdes en raison de leur faible potentiel redox, réduisent les radicaux hydroxyles par transfert d'hydrogène. Les radicaux libres seraient responsables d'altérations des acides nucléiques et des processus d'altération ainsi leur propriété de piègeurs de radicaux libres implique les flavonoïdes dans la prévention des dommages oxydatifs causés par les ROS sur les molécules cellulaires. La feuille est en fait le siège de biosynthèse des polyphénols (flavonoïdes) dans le chloroplaste. William et Hopkins(2003) ont rapporté que deux flavonols (Kampférol et quercétine) sont impliqués dans la croissance de la plante régulée par la lumière. La présence de flavonoïdes dans les bulbes bien que leurs teneurs soient faibles pourraient s'expliquer par leur implication dans l'établissement de la symbiose endomycorhizienne caractérisant les plantes à bulbes. La nécessité des flavonoïdes inducteurs a été démontrée en 1986. Les mécanismes d'interaction entre les composés phénoliques inducteurs et la protéine NOD produit par différentes espèces de Glomeromycètes est mal connu.

IV Essai de détermination des caryotypes des deux espèces

Le dénombrement chromosomique effectué sur plusieurs plaques métaphasiques à été réalisé à partir de mitose somatique des deux populations du *Prospero autumnalis* et *Hyacinthoides aristidis*.

Plusieurs essais ont été faits afin d'obtenir des plaques métaphasiques nettes pour le dénombrement des chromosomes des deux populations. Les 2 figures citées ci-dessous montrent que les plaques observées sous microscope photonique G : 40×10 ne permettent pas de compter le nombre des chromosomes à cause probablement de la mauvaise conservation du matériel biologique relatif aux racines des deux espèces de *Hyacinthaceae*.

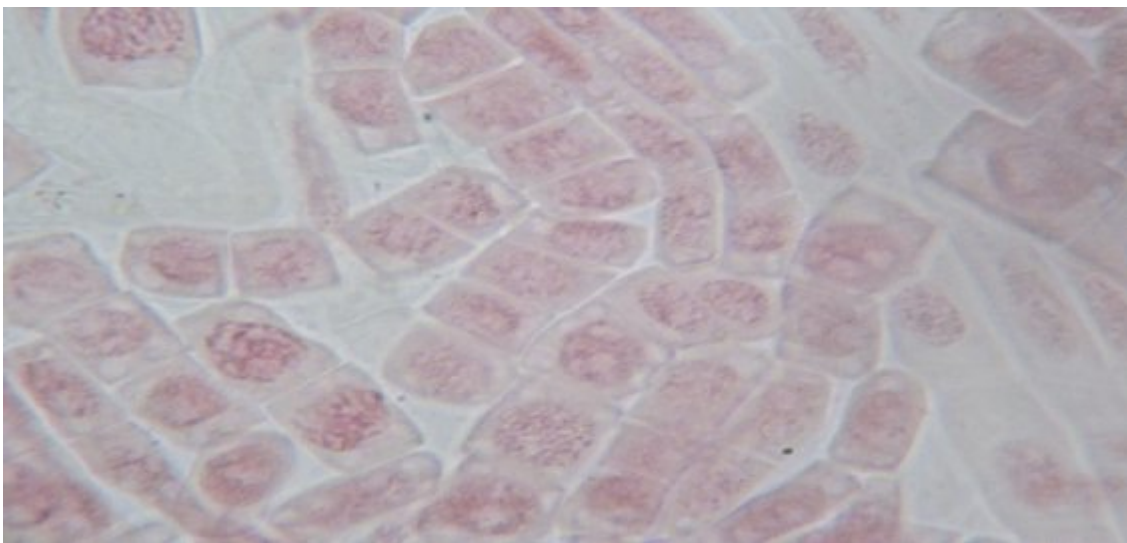


Figure 23: Différentes phases mitotiques de *Prospero autumnalis* observées au microscope photonique G : 40×10 (Laboratoire de CIV, 2016).

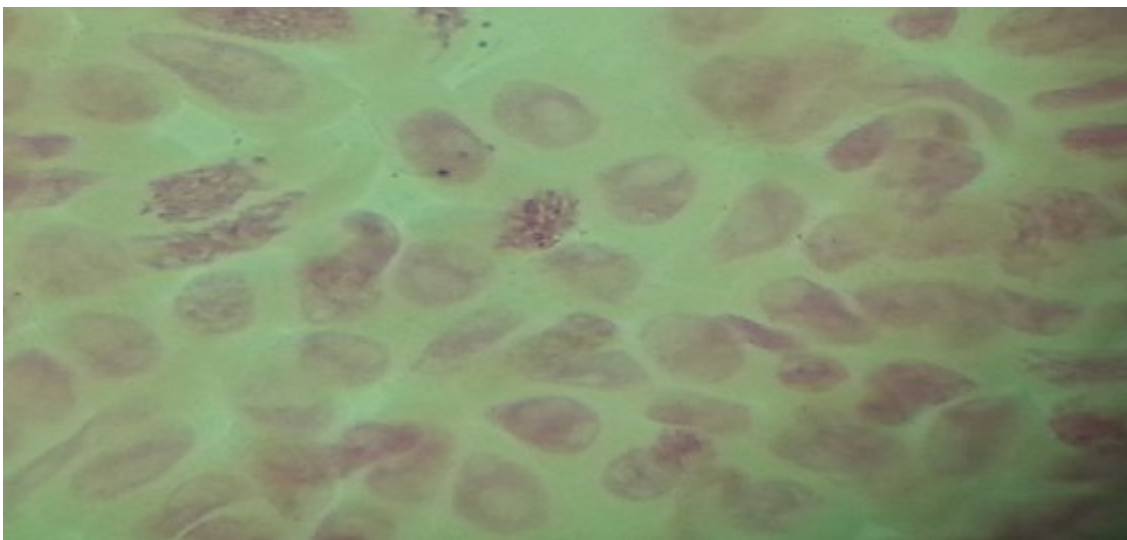


Figure24 : Différentes phases mitotiques de *Hyacinthoides aristidis* observées au microscope photonique G : 40×10 (Laboratoire de CIV, 2016).

D'après les figures 23 et 24 le nombre des chromosomes dénombré est approximativement égale à ($2n=14$) pour *Prospero autumnalis* et ($2n=16$) pour *Hyacinthoides aristidis*.

Selon HAMOUCHE (2014), les trois nombres chromosomiques rencontrés en Algérie ($2n = 14$, $2n = 28$ et $2n = 42$) correspondent aux trois niveaux de ploïdie $2x$, $4x$ et $6x$, reconnus dans le complexe polyploïde de *Prospero autumnalis*.

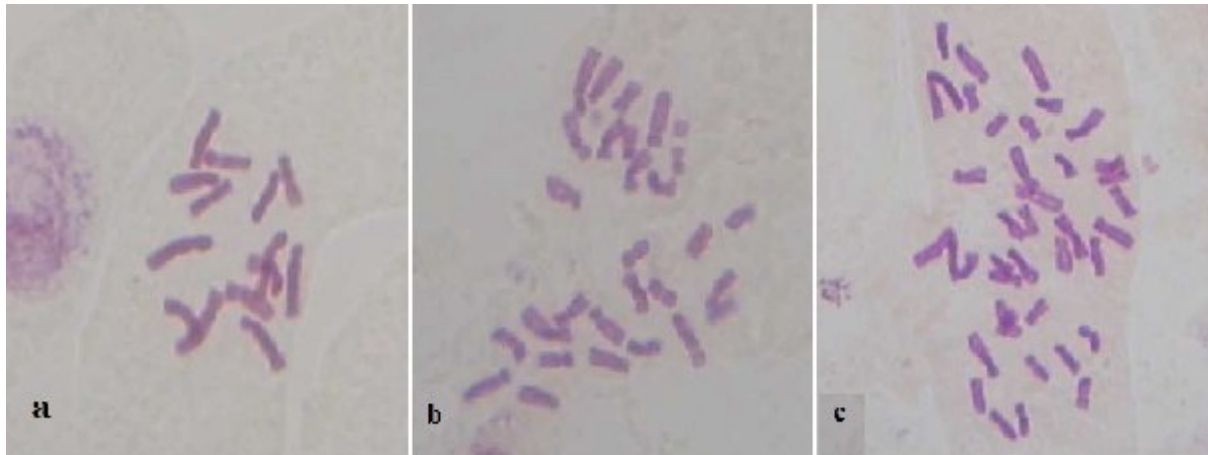


Figure25 : Caryotype de *Prospero autumnalis* d'après HAMOUCHE (2014).

a : $2n = 2x = 14$

b : $2n = 4x = 28$

c : $2n = 6x = 42$

A l'issue de ce travail, l'étude morphométrique a montré qu'il y a une différence significative entre les différents organes (feuilles, fleurs et bulbes) des deux espèces de Hyacinthacées (*Prospero autumnalis* et *Hyacinthoides aristidis*).

Dans l'étude des flavonoïdes, l'hydrolyse acide effectuée, nous a permis d'identifier l'existence des composés flavonoïques dans les feuilles et les bulbes.

Les dosages effectués sur les phases étherées et acides extraites des feuilles et des bulbes des deux espèces ont mis en évidence, la présence de 3 classes de flavonoïdes (Aglycones, Anthocyanes et C-glycosides).

Les feuilles ont révélé une teneur plus importante en flavonoïdes que les bulbes.

L'étude des caryotypes par la méthode de Jahier *et al.*, (1992) a montré que le nombre de chromosomes dénombré est approximativement égale à ($2n=14$) pour *Prospero autumnalis* et ($2n=16$) pour *Hyacinthoides aristidis*.

En perspectives d'étude, il faut savoir qu'il reste encore beaucoup de plantes locales utiles qui n'ont pas été étudiées et qui n'ont pas été analysées afin de déterminer leurs potentialités, dans différents domaines et qui mériteraient d'être investiguées.

Refaire et approfondir l'étude cytogénétique en vue d'élaborer un caryotypique. Il serait également utile d'approfondir les études concernant l'identification des principes actifs du point de vue qualitatif et quantitatif.

Déterminer les chémotypes exacts et complet par CCM, CP, CPG et HPLC. Envisageant des expériences "in situ" en testant ces principes sur des cas pathologiques.

Il serait également intéressant d'extraire les autres principes actifs de la plante tels que les saponosides, tanin et alcaloïdes et de tester leur pouvoir antimicrobien et bactéricide sur un large panel de souches bactériennes et fongiques devenues, à l'heure actuelle, multi résistantes aux antibiotiques.

- **AIT AMEUR H et BENRAIS. (1999)** Etude des composés phénoliques du genre Tamarix Mémoire de DES institue Biologie USTHB. 50P.
- **AMIROUCHE R et MISSET M. T. (2009)** Flore spontanée d'Algérie : différenciation écogéographique des espèces et polyploidie Flore spontanée d'Algérie : Cahier Agriculture, vol.18.
- **APCIII. (2009)** An update of the Angiosperme Phylogeny Group Classification for the orders and families of flowering plants: APGIII. *Bot. J. Linnean Society* 161: 105-107
- **BATE-SMITHE, E.C. (1945)** The phenolic constituents of plants and their taxonomic significance. *J. Linn. Soc. of London* 58 (571), 95.
- **BATTANDIER J.A et TRABUT. (1985)** Flore de l'Algérie et catalogue des plantes du Maroc.Vol.2.TomII.Alger et Paris.
- **BECHEER .R. (2003)** Proceedings of the Third International Scientific Symposium on Tea and Human Health: Role of Flavonoids in the Diet Overview of Dietary; Flavonoid: Nomenclature, Occurrence and Intake1. *Nutr. Rev.*, 3: 3248-3250.
- **BOTIMEAU M. (2010)** Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs, Ed : Tec & Doc, Paris.
- **BRULLO C., SALVATOR B., GIANPIETRO GUISSO D. G., PIETRO P. et CRISTINA S. (2009)** Prospero hierae (Hyacinthaceae), a New Species from Marettimo Island (Sicily). *Phyton (Horn. Austria)*. Vol.49, Fasc. 1, 93-104.
- **BRUNETON J. (1999)** Pharmacognosie, photochimie, plantes médicinales. 3éme. Ed, Lavoisier, Paris, 1120 p.
- **BRUNETON J. (1993)** Pharmacognosie, phytochimie, Plantes médicinales. 2éme. Ed : Lavoisier, Paris.
- **BURNIE G. (2004)** Annuelles et bulbes .groupe Eyrolles pour l'édition française.
- **CAMBEL M. (1993)** The biochemistry and molécular biology of lignification: problems, progress and prosects. 111P.
- **CHEHRIT F. (1995) :** Caractérisation et étude de la diversité génétique *Taqer Buch T*, cultivar de palmier dattier, résistant à la fusariose vasculaire. Thèse de magistère. UMMTO, 150P.
- **CRONQUIST A. (1981)** An integrated systeme of classification of the flowering plants. Naeva. York: Columbia University Press. New york.

- **DELAVEAU P. (1988)** Cahier nutritionnel diététique : polyphénol et tannins dans l'alimentation. Ed : Tec & D. 137-139.
- **DE-YUAM H. (1982)**. Cytotype variation and polyploidy in *Scilla autumnalis* L. (Liliaceae). *Hereditas*, Vol.97, 227-235.
- **FAVARGER C. et SILJAK-YAKOVLEV G. (1986)** A propos de la classification des taxons endémiques basée sur la cytotaxonomie et la cytogénétique. Colloque international de botanique pyrénéenne, la Cabanasse (Pyrénées-Orientales). Société Botanique de France. Groupement Scientifique Isard. Paris.
- **GRESELL P., CERLETTI C., GUGLIELMINI G., PIGNATELLI P., DEGAETANO G. et VIOLI F. (2011)** Effects of resveratrol and other win polyphenols on vascular function: an update. *J. of Nutr Biochem.*, 22:208-211.
- **HAMMICHE V., MERAD R., AZZOUZ M. (2013)** Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen. Ed : Springer, Paris.
- **HAMMOUCHE Y. (2014)** Etude biosystématique et phylogénétique de *Scilles automnales* des genres *Prospero salisb* *Barnardia Lind.* et *Hyacinthoides* Rothm. (Asparagaceae).
- **HAMMOUCHE Y., AMIROUCHE N., MISSET M-T., AMIROUCHE R. (2010)** Cytotaxonomy of autumnal flowering species of Hyacinthaceae from Algeria. *Plant evol*, Vol.285, 117-187.
- **HARBORN J.B. (1993)** Constraints of the evolution of biochemical Path Ways *Bio l. J. of the Linnean Societ.* 39: 135-151.
- **HARBORNE J.B. (1990)** Constraints on the evolution of biochemical Pathways. *Biol. J. of the Linnean Societ.*
- **HENNEBELLE T., SAHPAZ S. et BAILLEUL F. (2004)** Polyphénols végétaux, sources, utilisation et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif *Phytothérapie*. Springer-Verlag, 1 : 3-6.
- **JAHIER J., CHEVRE A.M., DELOURNE R., EBER F., TANGUY A.M. (1992)** Techniques de cytogénétique végétale. Ed INRA. Paris, 184P.
- **JUDD W., CAMPBELL C., BOUHARMONT J., KELLOGG EA., STEVENS P., EVRARD C. (2002)** Botanique Systématique: Une Perspective Phylogénétique. Ed. De Boeck Université. Belgique.
- **LEBERTON P., JAY M., VOIRIN B. (1967)** Sur l'analyse qualitative et quantitative des flavonoïdes. *Chim. Anal. Fr*, 49 (7) : 375-383.

- **MACHEIX J.J., FLEURIET A. et P. SARNI-MAN CHADO F. (2006)** Composés phénoliques dans la plante-structure, biosynthèse, répartition et rôles. Les polyphénols en agroalimentaire. Ed : Lavoisier, Paris.
- **MAIRE R. (1958)** Flore de l'Afrique du nord. Vol.5. Ed : Le chevalier, Paris. 150 ; 169 ; 134-135P.
- **MOULTI-MATI F. et KEBAB R. (2014)** Etude du pouvoir antioxydant des polyphénols issus de margarines d'olives de la variété Chamlal : Evaluation de l'activité avant et après déglycosylation.
- **MULHOLL et D-A., SCHWIKKARD S.L., CROUCH N-R. (2013)** The chemistry and biological activity of the Hyacinthaceae. Natural Product Reports, Vol.30 No.9, P.1153-1266.
- **PERRIN J.L. (1992)** Les composés mineurs et les antioxygènes naturels de l'olive et de son huile. Revue Française des corps gras, No.4, 25P.
- **PFOSSER M., SPETA F. (2001)** Bufadienolides and DNA sequences: on lumping and smashing subfamily Urgineoideae (Hyacinthaceae). *Stapfia* 57: 177-250
- **QUEZEL P. et SANTA S. (1962)** Nouvelle flore de l'Afrique de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Vol.1. CNRS, Paris. 85-99P.
- **RIBEREAU-GAYON P. (1968)** Les composés phénoliques des végétaux. Ed: Dunod, Paris. 115-142P.
- **RICHTER G. (1993)** Métabolisme des végétaux. Ed: Presse poly techniques et universitaires romandes, 526p.
- **ROBARDS K. (2003)** Strategies for determination of bioactive phenols in plants, fruits and vegetables. *J. of Chromatography A*, 1000: 657-691.
- **ROBARDS K.A., PAUL P., PRENZLER A., PRENZLER A., GREG TUCKER B., PRASAN SWATSITANG B. et WILLIAM G. (1999)** Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem*, 66: 401-436.
- **SANTOS-BUELGA C. et SCALBERT A. (2006)** Proanthocyanidins and tannin-like compounds-Nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* 80p.
- **SPETA F. (1982)** Über Die Herbstblühenden Scillen des Mittelmeerraumes. *Linzer Biol Beitr*, 18: 399-416.
- **SYED SHUJAIT A., Yu Y., PFOSSER M., WETSCHING W. (2011)** Inferences of biogeographical histories within subfamily Hyacinthoideae using S-DIVA and

Bayesian binary MCMC analysis implemented in RASP (Reconstruct Ancestral state in phylogenies) *Annals of Botany*, P.1-13.

- **TAO L. et LAMBERKT J.D. (2014)** Polyphenols in the Prevention and Treatment of Vascular and Cardiac Disease, and Cancer. *Polyphenol in Human Health & Disease.*, 2: 1191-1196.
- **VANGLAN Hellemont. (1986)** compendium de phytothérapie. Ed: service scientifique de l'APB: 153-154.
- **VANGLAN H.E., TAYLOR S., PARKER J.S. (1997)** The ten cytological races of the *Scilla autumnalis* species complex *Heredity*. 73-373.
- **VELA E. et BENHOUBOU S. (2007)** Evaluation d'un nouveau point chaud de biodiversité végétale dans le Bassin méditerranéen (*Afrique du Nord*). *Comptes Rendus de Biologies*.330 : 589-592.
- **VENTAT RAMADA M., Prasanna P-V., Venu P. (2015)** Le *debouriahyderabadensis* (Hyacinthaceae), a new species from india .*Kew BULLETIN*, Vol.67, P.1-4.
- **WATSON L., DALLWITZ M. J. (2000)** The families of flowering plants: Descriptions, illustrations, identifications and information Retrieval. [http://www biodiversity. Uno. edu/delta](http://www.biodiversity.uno.edu/delta).
- **WILLERY D. (2013)** *Plantes vivaces*. Ed : Ulmer, rue blanche 75009, Paris.
- Références électroniques:

<http://www.botagora-fr/fr/botanique/fiches-botaniques.aspx>

<http://gdebelaire.com/alb/alb4.html>

http://fr.wikipedia.org/wiki/nule_viqueuse

www.tla-botanica.org

<http://Botanicus.org>

www.jardiniers

www.rsc.org/npr

Annexe 1 : Matrice des mesures morphométriques des feuilles et bulbes de *Prospero autumnalis* et *Hyacinthoides aristidis*

Tableau1 : Population 1 (*Prospero autumnalis*).

Caractères	A	B	C	D	E	F	G	H
1	7.2	0.1	3	1.4	23.7	8.5	1.4	12
2	4.2	0.2	3	1.6	15.5	3.5	1.2	7
3	5.5	0.3	2	1.7	19.2	2.7	0.8	6
4	5	0.1	2	1.1	15.1	2.1	1	4
5	3.5	0.2	2	1.5	21.4	7.7	1.8	11
6	6.3	0.2	3	1.4	14.4	5.2	0.8	10
7	3.1	0.1	3	1.7	19.3	5.8	1	10
8	5.5	0.1	2	1.2	14.3	4.2	1	8
9	2.2	0.1	3	1	15.6	4	1	3
10	7.6	0.1	2	1.3	19.3	4.4	0.8	6

Tableau2 : Population 2 (*Hyacinthoides aristidis*).

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	6	0.8	4	0.7	10.3	2.9	0.5	19
2	6.3	0.8	3	1	8.8	1.2	0.4	6
3	6.8	0.9	3	0.7	10.7	2	0.7	9
4	6	0.7	4	0.8	6	0.2	0.2	4
5	6	0.8	3	1	8.3	1.4	0.4	7
6	5.8	1	4	1	6.5	0.2	0.2	6
7	4.7	0.7	4	1.1	5.2	0.8	0.4	6
8	5.4	0.6	3	0.4	10	1.2	0.4	8
9	7.4	0.8	4	0.7	9	1.2	0.3	10
10	10	1.4	4	1.8	9	1.2	0.5	9

Annexe 2 : Extraction des polyphénols par hydrolyse acide.

Dilution de HCl 10N en HCl 2N

HCl à 37 % (flacon initial)

$$\left. \begin{array}{l} 37\text{g} \longrightarrow 100 \text{ ml} \\ X \text{ g} \longrightarrow 1000 \text{ ml} \end{array} \right\} X = 370 \text{ g}$$

$$\left. \begin{array}{l} 1 \text{ mol d'HCl} = 36.5 \text{ g} \\ X \text{ mol} \longrightarrow 370 \text{ g} \end{array} \right\} X = 10.13 \text{ mol}$$

(HCl 10 N = 370g HCl + 1000 ml d'eau distillée = la solution mère d'HCl 37 %)

$$\left. \begin{array}{l} 10 \text{ N} : 10.13 \text{ mol} \longrightarrow 1000 \text{ ml} \\ 2 \text{ N} : 2 \text{ mol} \longrightarrow X \text{ ml} \end{array} \right\} X = 197.4 \text{ ml}$$

(197.4 ml d'HCl 10 N ajusté jusqu'à 1000 ml d'eau distillée)



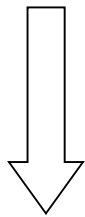
Séparation à l'éther
diéthylique



Hypophase rouge Anthocyanes
et C-glycosides



Séparation au n-butanol



Extrait éthanolique de la phase étherée.



C-glycosides

Quelques étapes du protocole expérimental d'extraction des flavonoïdes

Annexe4 : solutions utilisées pour l'étude cytogénétique des deux espèces de Hyacinthaceae

Préparation de la solution d'acide de 100ml d'acide acétique à 90%

- ❖ 90 ml d'acide acétique + 10 ml d'eau distillé

Préparation de la solution de 100ml d'éthanol à 70%

- ❖ 70ml d'éthanol + 30 ml d'eau distillé

Préparation de la solution de α -Bromonaftalène

- ❖ 5 à 6 gouttes de α -bromonaftalène dans un pilulier d'eau de robinet, agité très bien jusqu'à se que la solution deviens opaque

préparation de la solution d'HCl 1N :

10ml d'HCl 10N+90ml d'eau distillée

Annexe3 : Dosages quantitatifs des flavonoïdes.**1- Les feuilles****1-1 : Population 1 *Prospero autumnalis*****Tableau3 : Dosage quantitatif des Anthocyanes (540nm) HCL2N**

Echantillon	Individu1	Individu2	Individu3
Volume (ml)	8.5	8.5	8.5
Poids(g)	0.115	0.115	0.115
Dilution(d)	d=1	d=1	d=1
Densité optique(DO)	0.035	0.035	0.035
T%(mg/g)	0.134	0.134	0.134

Tableau4 : Dosage quantitatif des c-glycosides (340nm) n.butanol

Echantillon	Individu1	Individu2	Individu3
Volume (ml)	7	7	7
Poids(g)	0.115	0.115	0.115
Dilution(d)	d=1	d=1	d=1
Densité optique(DO)	0.117	0.117	0.117
T%(mg/g)	0.168	0.168	0.168

Tableau5 : Dosage quantitatifdes Aglycones (420nm) Ethanol pur et AL CL₃

Echantillon	Individu1	Individu2	Individu3
Volume (ml)	8	8	8
Poids(g)	0.115	0.115	0.115
Dilution(d)	d=1	d=1	d=1
Densité optique(DO) (éthanol)	0.083	0.041	0.044
Densité optique(DO) (ALCL3)	0.025	0.025	0.025
Δ DO	0.008	0.008	0.008
T%(mg/g)	0.015	0.015	0.015

1-2 :Population2*Hyacinthoides aristidis***Tableau6** : Dosage quantitatif des Anthocyanes (540nm) HCL2N

Echantillon	Individu1	Individu2	Individu3
Volume (ml)	30	30	30
Poids(g)	0.415	0.415	0.415
Dilution(d)	d=1	d=1	d=1
Densité optique(DO)	0.024	0.024	0.024
T%(mg/g)	0.090	0.090	0.090

Tableau7 : Dosage quantitatif des c-glycosides (340nm) n.butanol

Echantillon	Individu1	Individu2	Individu3
Volume (ml)	26	26	26
Poids(g)	0.415	0.415	0.415
Dilution(d)	d=1	d=1	d=1
Densité optique(DO)	0.057	0.057	0.057
T%(mg/g)	0.084	0.084	0.084

Tableau8 : Dosage quantitatif des Aglycones (420nm) Ethanol pur et AL CL₃

Echantillon	Individu1	Individu2	Individu3
Volume (ml)	9	9	9
Poids(g)	0.415	0.415	0.415
Dilution(d)	d=1	d=1	d=1
Densité optique(DO) (éthanol)	0.022	0.022	0.022
Densité optique(DO) (ALCL ₃)	0.007	0.007	0.007
Δ DO	0.015	0.015	0.015
T%(mg/g)	0.004	0.004	0.004

2 : Les bulbes

2-1 : Population 1 *Prospero autumnalis*

Tableau9 : Dosage quantitatif des Anthocyanes (540nm) HCL2N

Echantillon	Individu1	Individu2	Individu3
Volume (ml)	37	37	37
Poids(g)	0.5	0.5	0.5
Dilution(d)	d=1	d=1	d=1
Densité optique(DO)	0.371	0.371	0.371
T%(mg/g)	0.0427	0.0427	0.0427

Tableau10 : Dosage quantitatif des C-glycosides (340nm) n.butanol

Echantillon	Individu1	Individu2	Individu3
Volume (ml)	42	42	42
Poids(g)	0.5	0.5	0.5
Dilution(d)	d=1	d=1	d=1
Densité optique(DO)	0.067	0.067	0.067
T%(mg/g)	0.133	0.133	0.133

Tableau11 : Dosage quantitatif des Aglycones (420nm) Ethanol pur et AL CL₃

Echantillon	Individu1	Individu2	Individu3
Volume (ml)	4	4	4
Poids(g)	0.5	0.5	0.5
Dilution(d)	d=1	d=1	d=1
Densité optique(DO) (éthanol)	0.024	0.024	0.024
Densité optique(DO) (ALCL3)	0.017	0.017	0.017
Δ DO	0.007	0.007	0.007
T%(mg/g)	0.0007	0.0007	0.0007

2-2/ Population 2 *Hyacinthoides aristidis***Tableau12** : Dosage quantitatif des Anthocyanes (540nm) HCL2N

Echantillon	Individu1	Individu2	Individu3
Volume (ml)	34	34	34
Poids(g)	0.5	0.5	0.5
Dilution(d)	d=1	d=1	d=1
Densité optique(DO)	0.015	0.015	0.015
T%(mg/g)	0.053	0.053	0.053

Tableau13 : Dosage quantitatif des C-glycosides (340nm) n.butanol

Echantillon	Individu1	Individu2	Individu3
Volume (ml)	40	40	40
Poids(g)	0.5	0.5	0.5
Dilution(d)	d=1	d=1	d=1
Densité optique(DO)	0.018	0.018	0.018
T%(mg/g)	0.034	0.034	0.034

Tableau14 : Dosage quantitatif des Aglycones (420nm) Ethanol pur et AL CL₃

Echantillon	Individu1	Individu2	Individu3
Volume (ml)	3.5	3.5	3.5
Poids(g)	0.5	0.5	0.5
Dilution(d)	d=1	d=1	d=1
Densité optique(DO) (éthanol)	0.051	0.051	0.051
Densité optique(DO) (ALCL ₃)	0.008	0.008	0.008
Δ DO	0.043	0.043	0.043
T%(mg/g)	0.004	0.004	0.004

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

UNIVERSITE MOULOU D MAMMERI DE TIZI-OUZOU



Faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques

Département de biologie animale et végétale

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master en biologie

Option : Génétique et amélioration végétales

Etude Morphométrique de *Hyacinthoides aristidis* et *Prospero autumnalis*.

Extraction et caractérisation de trois classes de flavonoïdes et essai d'élaboration des caryotypes des deux espèces.

Présenté par : M. AIT MOUFFOK Malek.

M^{lle}. TAIBI Sarah.

Présidente : Mme GOUCEM K. Maitre de conférences classe B à l'U.M.M.T.O

Promotrice : Mme TALEB K. Maitre de conférences classe B à l'U.M.M.T.O

Co-promoteur: M. BAIK N. Doctorant à l'U.S.T.H.B

Examinatrice : Mlle ABDELLAOUI K. Maitre assistante chargée de cours classe A à l'U.M.M.T.O

Examineur : M. MEDJEBEUR Dj. Maitre assistant chargé de cours classe A à l'U.M.M.T.O

Promotion : 2015/2016

Remerciements

*Au terme de ce modeste travail, nous tenons à remercier **Dieu** de nous avoir mis sur la voie des études et de nous avoir donné la volonté et le courage de mener à terme ce travail.*

*Nous remercions particulièrement notre promotrice Madame **TALAB K.** Etre vos étudiants a été une chance que nous avons su saisir. Nous avons été comblés par les enseignements de qualité dont nous avons bénéficié à vos côtés. Votre disponibilité, votre rigueur et vos qualités intellectuelles forcent notre admiration. Veuillez trouver ici chère Promotrice, le témoignage de notre sincère reconnaissance.*

*Nous remercions beaucoup **Mr BAIK N.** de nous avoir ramené les échantillons et de nous avoir assistés lors des caractérisations morphologiques et l'extraction des polyphénols.*

*Nos remerciements les plus sincères s'adressent aux professeur **YAKOUB S.** responsable du Master Génétique et amélioration des plantes et du laboratoire CIV, qui nous a hébergés pendant la partie expérimentale.*

*Nos remerciements les plus sincères s'adressent aux membres du jury ; a Madame **GOUCEM K.** d'avoir accepté de présider ce jury, Mr **MEDJEBEUR DJ.** Et Mademoiselle **ABDELLAOUI K.** de nous avoir fait l'honneur d'examiner ce travail et de l'enrichir par leurs critiques constructives.*

*Nous remercions Mr **ALI SOFIANE** et **SMAIL** de notre bibliothèque central.*

*Nous tenons à remercier Madame **AMIROUCHE N.** Professeur à l'USTHB (Alger) pour son accueil dans son laboratoire éco-génétique et son aide avec les documents et les articles.*

*Nous n'oublierons pas de remercier Mademoiselle **OURARI F.** pour avoir eu la gentillesse de nous envoyer les produits que nous avons utilisés dans l'étude du caryotype de nos espèces et pour tous les conseils qu'elle nous a prodigués à distance.*

Nous remercions également toutes les personnes qui nous ont aidés dans la recherche bibliographique à la bibliothèque de la faculté biologie te central de l'USTHB, l'INA, et la bibliothèque de la faculté SNV de Blida.

*Merci à **DJAZIYA** et **WAHIBA** pour leur aide.*

Merci à tous nous enseignants.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

- ✓ *A mes très chers parents, aucune dédicace aussi parfaite et douce soit-elle, ne saurait exprimer toute ma reconnaissance et tout l'amour que je vous porte.*

Ce travail présente le fruit de votre soutien, vos sacrifices, et vos encouragements.

Que dieu vous protège et vous accorde une longue vie pleine de santé et de bonheur.

- ✓ *A mes frères et ma très chère sœur pour leurs encouragements et leurs aides.*
- ✓ *A ma nièce Maria que j'adore que dieu la garde.*
- ✓ *A tous mes amis et à tous les membres de ma famille.*

Sarah 

Résumé :

Cette étude a pour but d'évaluer les différences morphométriques entre les feuilles et les bulbes des espèces *Hyacinthacées Prospero autumnalis* et *Hyacinthoides aristidis*, provenant toutes deux de la région de Tizi Rached. L'extraction et le dosage des flavonoïdes à partir des feuilles et des bulbes ont montré que les feuilles sont plus riches en flavonoïdes que les bulbes. Les teneurs en c-glycosides sont plus importantes que celles des anthocyanes et aglycones flavonoïques chez les deux espèces considérées. L'essai élaboré dans le but de déterminer le nombre de chromosomes a révélé que *Prospero autumnalis* avec $2n = 14$ et *Hyacinthoides aristidis* $2n = 16$.

Mots clés : *Prospero autumnalis*, *Hyacinthoides aristidis*, Tizi Rached, flavonoïdes, chromosomes.

Abstract :

This study aims at estimating the morphometric differences between leaves and bulbs of two species of *Hyacinthacées Prospero autumnalis* and *Hyacinthoides aristidis*, coming from the region of Tizi Rached. The extraction and the dosage of flavonoids from leaves and bulbs showed that leaves are richer in flavonoids than bulbs. The contents of c-glycosides are most important than those of the anthocyanins and aglycones flavonoïques to both considered species. The trial developed with the aim of determining the number of chromosomes revealed that *Prospero autumnalis* with $2n = 14$ and *Hyacinthoides aristidis* $2n = 16$.

Keywords: *Prospero autumnalis*, *Hyacinthoides aristidis*, Tizi Rached, flavonoids, chromosomes.

Dédicaces

En guise de reconnaissance je dédie ce mémoire :

A mes très chers parents, pour leur dévouement, leur amour, leur soutien moral et financier durant toute ces années d'études.

Je prie ALLAH pour qu'il vous prête longue vie et bonne santé.

A ma chère sœur bien aimée et son mari ;

A mon frère adoré SALEM ;

A tous les membres de ma grande famille ;

A tous mes amis et collègues ;

A la mémoire de mon cher ami SAMIR FRAGA que DIEU l'accueillir et le garde dans son vaste paradis ;

A toutes les personnes qui m'aiment, et que j'aime ;

A toutes les personnes qui aiment le savoir.

MALEK

Figure 1 : Distribution de l'espèce <i>Hyacinthoides</i> en Afrique (site African Flowering Plants Database)	3
Figure 2 : Morphologie de <i>Hyacinthoides aristidis</i> (Coss et Rothm, 2015)	5
Figure 3 : Distribution de l'espèce <i>Hyacinthoides aristidis</i> en Afrique (Site African Flowering Plants Databas)	6
Figure 4 : Morphologie de <i>Prospero autumnalis</i> (Amirouche, 2014)	9
Figure 5 : Distribution de l'espèce <i>Prospero autumnalis</i> (L.) Speta (1998) en Afrique (site African Flowering Plants Database)	9
Figure 6 : Structure générale de flavonoïdes (Bruneton, 1999)	13
Figure 7 : Feuilles de <i>Hyacinthoides aristidis</i> séchés et coupés	16
Figure 8 : Bulbes de <i>Hyacinthoides aristidis</i> séchés et coupés	17
Figure 9 : Bulbes de <i>Prospero autumnalis</i> séchés et coupés	17
Figure 10 : Poudre végétale de <i>Hyacinthoides aristidis</i>	18
Figure 11 : Poudre végétale de <i>Prospero autumnalis</i>	18
Figure 12 : Insufflation toutes les 10 mn	19
Figure 13 : Phases d'extraction des flavonoïdes	20
Figure 14 : Extraits flavonoïques obtenus	20
Figure 15 : Protocole d'analyse général des flavonoïdes (Leberton, 1967)	21
Figure 16 : Rhizogenèse à partir des bulbes de <i>Hyacinthoides aristidis</i> et <i>Prospero autumnalis</i>	24
Figure 17 : Moyenne des 8 caractères des 2 populations mesurés chez <i>Prospero autumnalis</i> et <i>Hyacinthoides aristidis</i>	27
Figure 18 : Moyenne des teneurs absolues des trois classes de flavonoïdes étudiées des feuilles et des bulbes de la population1 (<i>Prospero autumnalis</i>)	28
Figure 19 : Moyenne des teneurs absolues des trois classes de flavonoïdes étudiées des feuilles et des bulbes de la population2 (<i>Hyacinthoides aristidis</i>)	29
Figure 20 : teneurs en aglycones dans les deux organes (feuilles, bulbes) de deux populations (<i>Prospero autumnalis</i> et <i>Hyacinthoides aristidis</i>)	31
Figure 21 : teneurs en anthocyanes dans les deux organes (feuilles, bulbes) de deux populations (<i>Prospero autumnalis</i> et <i>Hyacinthoides aristidis</i>)	32
Figure 22 : teneurs en c-glycosides dans les deux organes (feuilles, bulbes) de deux populations (<i>Prospero autumnalis</i> et <i>Hyacinthoides aristidis</i>)	33

Figure 23 : Différentes phases mitotiques de <i>Prospero automnalis</i> observées au microscope photonique G : 40×10 (Laboratoire de CIV, 2016).	35
Figure 24 : Différentes phases mitotiques de <i>Hyacinthoides aristidis</i> observées au microscope photonique G : 40×10 (Laboratoire de CIV, 2016)	35
Figure 25 : Caryotype de <i>prospero automnalis</i> d'après HAMOUCHE (2014).	36

Liste des tableaux

Tableau 1 : Noms des quelques espèces du genre <i>Scilla</i> ayant changé de nom.	4
Tableau 2 : Les principales classes des composés phénoliques (MACHEIX <i>et al.</i> , 2006). ...	11
Tableau 3 : Caractères morphologiques mesurés chez les deux espèces de Hyacinthacées...	17
Tableau 4 : Prétraitement par deux agents mitoclasiques.	24
Tableau 5 : Moyenne \pm écarts types de caractères des 2 populations étudiées.	26
Tableau 6 : Moyennes \pm écarts types des teneurs absolues en trois classes flavonoïdes des deux organes (feuilles et bulbes) de la population 1 <i>Prospero autumnalis</i>	28
Tableau 7 : Moyennes \pm écarts types des teneurs absolues en trois classes flavonoïdes des deux organes (feuilles et bulbes) de la population 2 <i>Hyacinthoides aristidis</i>	29
Tableau 8 : Teneurs en aglycones dans les deux organes (feuilles et bulbes) des deux populations (<i>Prospero autumnalis</i> et <i>Hyacinthoides aristidis</i>).	30
Tableau 9 : Teneurs en anthocyanes dans les deux organes (feuilles et bulbes) des deux populations (<i>Prospero autumnalis</i> et <i>Hyacinthoides aristidis</i>).	31
Tableau 10 : Teneurs en c-glycosides de deux organes (feuilles, bulbes) de deux populations.	32
Tableau 11 : Variations des teneurs en composés flavonoïques (aglycones, anthocyanes et c-glycosides) dans les deux parties de la plante (feuille, bulbe) de deux populations <i>Prospero autumnalis</i> et <i>Hyacinthoides aristidis</i>	33

Sommaire

Remerciement

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Chapitre I synthèse bibliographique

I Généralités sur les scilles.....2

I-1 Présentation de la famille de Hyacinthaceae.....2

I-1-1 les sous familles de Hyacinthaceae.....3

I-2 Le genre Hyacinthoides.....4

I-3 Présentation de genre *Hyacinthoides aristidis*.....4

I-3-1 Description botanique 5

I-3-2 Aire de répartition 6

I-3-3 Systématique 6

I-4 Le genre *Prospero*..... 7

I-4-1 Présentation de *Prospero autumnalis* (L.) Speta8

I-4-2 Description botanique9

I-4-3 Aire de répartition9

I-4-4 Systématique10

I-5 Caryosystematique.....10

II Les polyphénols 11

II-1 Les différents familles de composés phénoliques.....11

II-2 Les flavonoides..... 12

II-3 Localisation et rôle des composés phénoliques13

II-4 Propriétés physico-chimiques 13

II-5 Domaine d'application des composés phénoliques.....14

II-6 Utilisation des acides phénoliques par la plante.....15

Chapitre II Matériel et méthodes

I Matériel végétal.....16

I-1 Station d'échantillonnage 16

I-1-1 Les feuilles16

I-1-2 Les bulbes16

II Méthodes 17

II-1 Etude morphologique17

II-2 Extraction des flavonoïdes par hydrolyse acide	18
II-3 Protocole expérimental	19
II-4 Analyse quantitative	22
II-5 Essai d'élaboration des caryotypes des deux espèces.....	24

Chapitre III Résultats et discussion

IVariabilités morphologique des deux espèces <i>Prospero autumnalis</i> et <i>Hyacinthoides aristidis</i>	26
I-1 Comparaison des moyennes des différents caractères étudiés	26
II Etude comparative de la composition en flavonoïdes entre les feuilles et les bulbes.....	28
II-1 Population 1 <i>Prospero autumnalis</i>	28
II-2 Population 2 <i>Hyacinthoides aristidis</i>	29
III Etude comparative entre la population 1 et 2 (<i>Prospero autumnalis</i> et <i>Hyacinthoides aristidis</i>)	30
IV Essai de détermination des caryotypes des 2 espèces.....	35
Conclusion et perspectives	37

Références bibliographique

Annexes

Les recherches sur les bienfaits des plantes sont toujours d'actualité, avec pour conséquences de nouvelles découvertes dont les applications sont nombreuses, aussi bien en médecine et en pharmacie que dans d'autres domaines tels que l'agroalimentaire et les industries chimiques (VAN HELLEMONT, 1986).

L'Algérie est considérée comme l'un des 33 points chauds de très forte biodiversité avec le plus grand nombre de plantes endémiques. C'est un pays possédant d'importantes richesses phytogénétiques. Cette richesse est principalement localisée dans les régions telliennes, les secteurs humides et subhumides qui comportent des «hotspots» ou points chauds de biodiversité unique (VELA et BENHOUBOU, 2007 ; AMIROUCHE et MISSET, 2009). Les taxons endémiques, occupent des aires géographiques plus réduites par rapport aux autres, représentant proches sur le plan systématique et sont donc en général des espèces rares. La sauvegarde du patrimoine génétique des espèces rares, relictuelles et endémiques est devenu une nécessité face aux menaces d'une civilisation de plus en plus envahissante (FAVARGER et SILJAK-YAKOVLEV, 1986).

Depuis les nombreux remaniements concernant l'ordre des Liliales et des Asparagales, la famille des Hyacinthaceae et devenue une famille singulière est devenue un bon exemple d'étude. Actuellement, la famille des Hyacinthaceae est positionnée dans l'ordre des Asparagales par de nombreux travaux systématiques (JUDD *et al.*, 2002 ; APGIII, 2009).

Pour cet intérêt grandissant des substances naturelles bioactives, les polyphénols conservent une place de choix dans la découverte de ces nouvelles molécules thérapeutiques, et capturent l'intérêt de plusieurs recherches vue le nombre de leur propriétés biologiques indénombrables, l'activité antioxydante est l'une de ces propriétés qui fait actuellement l'objet de nombreuses études (HENNEBELLE, 2006).

Cette étude repose sur une caractérisation morphologique et une quantification des polyphénols flavoniques ainsi qu'un essai de détermination des caryotypes des deux espèces de Hyacinthaceae *Hyacinthoides aristidis* et *Prospero autumnalis*.

Le premier chapitre porte sur une étude bibliographique relative aux deux espèces (*Hyacinthoides aristidis* et *Prospero autumnalis*), ainsi qu'aux polyphénols, le deuxième concerne le matériel et les méthodes utilisées, le troisième chapitre est consacré aux résultats et discussion et enfin une conclusion et perspectives d'étude terminent notre travail.

I- Généralités sur les scilles

Les scilles "sensu lato" sont des Plantes herbacées monocotylédones vivaces à bulbe. Leur feuilles sont simples, sessiles, entières, basilaires regroupées en rosette se développant pendant ou après la floraison. La hampe florale est aphyllé portant des inflorescences de type grappe rarement cyme. Les fleurs sont hermaphrodites, actinomorphes, pédonculées avec ou sans bractées florales. Le Périanthe est dialytépale à tépales uninerviés de couleur variable (lilas, violets ou bleus) disposés en deux verticilles. L'androcée est dialystémones, diplostémones, alternitépales à insertion du filet médifixe. L'ovaire est supère constitué de trois carpelles soudés uniloculés. Le style présent stigmate trilobé. Les ovules sont anatropes à placentation axile. le fruit est une capsule subglobuleuse, loculicide. Les graines ovoïdes, albuminées à embryon droit ou courbe.

Les Scilles d'Algérie se rapportent à trois genres appartenant à la famille des Hyacinthacée, *Prospero salisb*, *Barnardia lindley* et *Hyacinthoides* (Rothm) .Ces espèces sont endémiques à l'Algérie et la Tunisie. En Algérie, il semble que la zone naturelle de ces espèces est principalement la région de Kabylie à l'est d'Alger, mais il est possible de le trouver dans la partie occidentale jusqu'à Cherrhell (Hamouche 2014).

I-1 Présentation de la famille des Hyacinthaceae

Dans les flores de Maire(1958) et de Quezel et Santa (1962), les genres de la famille des Hyacinthaceae étaient regroupés dans l'ancienne famille des Liliaceae.

Actuellement, la famille des Hyacinthaceae est incluse dans la famille des Aspargaceae qui contient approximativement 70 genres et 1000 espèces et qui sont distribuées en Europe et dans la région extratropicale de l'Asie et de l'Afrique (Pfosser et Speta, 1999 ; Watson et Dallwitz, 2000).

Quelques genres transférés de la famille des Liliaceae aux Hyacinthaceae sont par exemple : *Bellevalia*, *Brimeura*, *Charybdis*, *Dipcadi*, *Drima* , *Hyacinthella*, *Hyacinthus*, *Muscari*, *Ornithogalum*, *Othocallis*, *Prospero* et *Scilla*....

La famille des Hyacinthaceae a plusieurs centres de diversité avec un grand nombre d'espèces en Afrique australe, en Méditerranée (Pfosser et Speta, 2001) et au Nord de l'Europe jusqu'au sud de l'Asie avec quelques espèces au Sud-Ouest Américain. Les taxons de cette famille sont adaptés à des climats saisonniers avec des périodes sèches et humides dans des régions tropicales et peu dans les régions forestières (figure1).



Figure1 : Distribution de l'espèce *Hyacinthoides* en Afrique (site African Flowering Plants Database).

En Algérie, les Hyacinthaceae se développent préférentiellement dans les biotopes frais du littoral, des collines du Sahel et de l'Atlas tellien. Certaines espèces sont menacées de disparition, leur habitat subissant d'importantes dégradations dues aux activités anthropiques telles que l'urbanisation, la pollution, la déforestation et l'érosion des sols (Hamouche, 2014) Certains taxons de cette famille sont largement répartis, d'autres sont endémiques.

I-1-1 Les sous-familles des Hyacinthaceae

L'analyse du séquençage de gènes nucléaire et chloroplastiques a permis à Pfosser et Speta (1999) et Manning et *al.*(2004) la reconnaissance de quatre sous-familles dans la famille des Hyacinthacées ce sont :Hyacinthoideae (contient 4000 espèces),Ornithogaloideae (supérieure a 100 espèces),Urgineoideae (il ya 200-300 espèces) ,oziroeioideae (Manning et *al.*,2009 ;Martinez-Azorin et *al.*,2011).

I-2 Le genre *Hyacinthoides*

Hyacinthoides est un genre de plantes herbacées vivaces, bulbeuses, blanchâtres, ovées, monocotylédones. Il appartient à la famille des Liliaceae selon la classification classique. La classification phylogénétique le place dans la famille des Hyacinthaceae (ou optionnellement dans celle des Asparagaceae).

Les espèces de ce genre ont eu plusieurs noms à travers l'histoire de la classification des espèces de Liliacées appartenant au genre *Scilla*. (Tableau 1)

Tableau1 : Représentation des noms des quelques espèces de genre *Scilla* qui ont subi des changements radicaux dans leur statut taxonomique.

<i>Ancien nom</i>	<i>Nouveau nom</i>
<i>Scilla autumnalis</i> L. Speta.	<i>Prospero autumnale</i> (L) Speta
<i>Scilla obtusifolia</i> Poir.	<i>Prospero obtusifolium</i> (Poir). Speta.
<i>Scilla artistidis</i> Coss.	<i>Hyacinthoides artistidis</i> Coss.
<i>Scilla numidica</i> Poir.	<i>Barnardia numidica</i> (Poir.) Speta.

Les espèces appartenant au genre *hyacinthoides* sont des plantes ligneuses avec des fleurs en forme de cloche de couleur bleu. Elles se distinguent des espèces appartenant au genre *scilla* par des bulbes se renouvelant chaque année et des fleurs portées par deux bractées bisanneles. Ces plantes sont rustiques, méditerranéennes, majoritairement distribuées dans la partie occidentale incluant l'Afrique du nord (Maroc, Algérie et Tunisie) (Grund mann et *al.*, 2010).

I-3 Présentation de *Hyacinthoides aristidis*

Hyacinthoides aristidis (coss.)Rothm(1944) est un parent de la jacinthe des bois et précédemment étiqueté *Scilla aristides*.

Il est originaire d'Algérie mais qui n'est pas connue à cause de sa première saison de floraison, d'habitude en Janvier mais peut s'étendre à février.

C'est un bulbe (une ampoule) nain tolérant au froid.

Il produit des pointes de fleur sur des tiges courtes avec deux feuilles vertes brillantes toutes basales, entourées inférieurement par 1-2 graines membraneuses blanchâtres très obtuses. La fleur est une nuance délicate de bleu.

I-3-1 Description botanique

Les feuilles sont engainantes n'atteignant pas 25cm de long, lancéolées aiguës plus ou moins obtuses et apiculées. Elles sont plus larges au sommet. Elles sont ordinairement au nombre de 2 parfois 3 maximum, à nervation parallèles. Les fleurs hermaphrodites sont groupées en inflorescence de type cyme. La pollinisation est assurée par les insectes (entomogame). Elles sont actinomorphes, hypogynes de coloration bleue. Elles sont tepaloides à deux verticilles, dialypétales uninerviés, à nervure bleue. Les pédoncules floraux étalés-dressés, anguleux, non denticulés. La fleur est munie à la base de deux bractées blanchâtres, membraneuses un peu inégales. L'androcée est constitué de six étamines. Les filets staminaux sont insérés à la base des tépales. Les anthères de couleur bleu sont médifixes à déhiscence longitudinale introrse. Le gynécée a un seul style de couleur bleu violet. Les tiges sont florifères dressées sillonnées-côtelées. Le fruit est une capsule noire à 3 sillons, L'ovaire est supère de coloration bleue à trois loges biovulés. La graine est subglobuleuse. Un bulbe tunique blanchâtre, avec des racines fasciculées sortant à la base et au milieu du bulbe (figure2).



Figure2 : Morphologie de *Hyacinthoides aristidis* (Coss et Rothm 2015).

Habitat : *Hyacinthoides aristidis* est une plante de demi-ombre préférant les sols légèrement acides et profonds limono-sableux. Elle apprécie les chênaies-hêtraies et les haies de *Fagetalia*, et de *Quercetalia robori-petraeae*.

I-3-2 Aire de répartition

Hyacinthoides se trouve en Algérie et en Tunisie. Dans la flore de Quézel et Santa (1962), Ce taxon est présent au niveau des secteurs K1 (grande Kabylie), K2 (petite Kabylie), et K3 (Numidie de Skikda à la frontière tunisienne).

Dans la flore de Maire (1958), elle se situe également en Algérie et Tunisie (figure3).

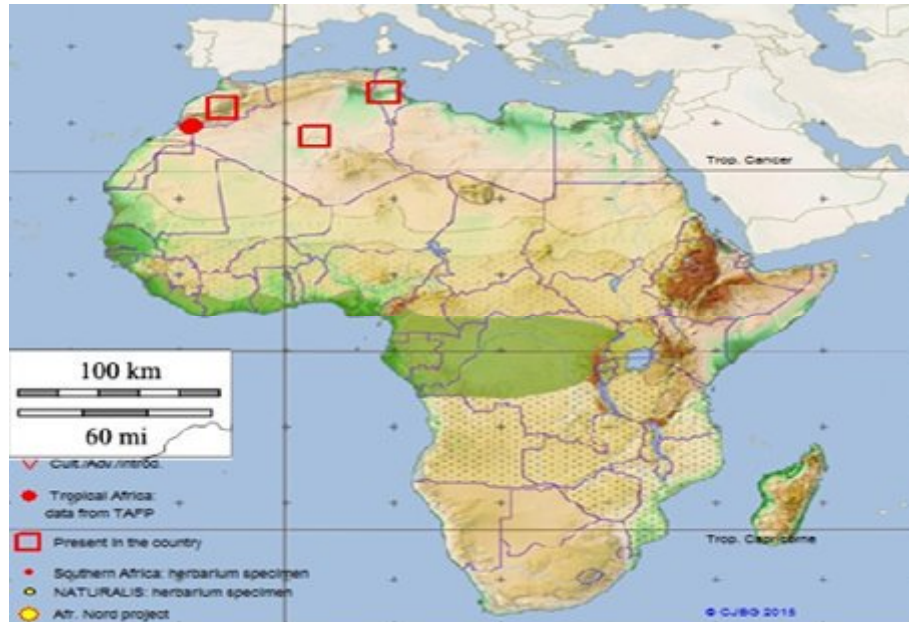


Figure3 : Distribution de l'espèce *Hyacinthoides aristidis* en Afrique (site African Flowering Plants Databas).

D'après la classification des espèces endémique l'espèce *Hyacinthoides* est considérée comme paleoendémique.

I-3-3 Systématique

Hyacinthoides aristidis est classé dans la systématique classique de Cronquist (1981) comme suit :

Règne	: Végétal
Embranchement	: Spermaphytes
Sous embranchement	: Angiospermes
Classe	: Monocotylédones
Sous/ classe	: Liliidae
Ordre	: Liliales
Famille	: Liliaceae
Sous /Famille	: Hyacinthoideae

Genre : *Hyacinthoides*
Espèce : *Hyacinthoides aristidis*

Nom binominal

Hyacinthoides aristidis (Coss).Rothm.1944

Classification phylogénétique (APGIII, 2009)

En phylogénétique *Hyacinthoides aristidis* appartient à :

Ordre : Asparagales
Famille : Hyacinthaceae

I-4 Le genre *prospero*

Prospero est une plante européenne et méditerranéenne qui appartient à la famille des Hyacinthaceae (ou Asparagaceae) autrefois inclus dans le genre *Scilla*.

Les feuilles les plus grandes des plantes adultes dépassent 1,5 mm de large, à section en croissant (face supérieure nettement concave et marges formant un angle aigu), au nombre de 4-8, émergeant peu après les pluies d'automne. Les inflorescences sont formées de 8-25 fleurs en racème. La hampe normalement dressée. La partie aérienne a longue mesure de 5-30 cm.

C'est un taxon très répandu dans le bassin méditerranéen, au moins occidental, mais remontant également vers le nord-ouest et le centre de l'Europe; ce dernier point suggère une correspondance avec les cyto-types polyploïdes, connus pour représenter exclusivement l'espèce en Europe non méditerranéenne (Vaughan et al., 1997). Toute la Corse et une grande partie de la France.

I-4-1 Présentation de *Prospero autumnalis* (L.) Speta

Prospero autumnalis (L.) Speta (syn. : *Scilla autumnalis* L.), est une plante qui appartient à la famille des Liliaceae selon la classification classique. La classification phylogénétique la place dans la famille des Hyacinthaceae (ou optionnellement dans celle des Asparagaceae).

Prospero autumnalis est une Plante vivace de petite taille mesurant 10-25 cm, à bulbe gros, ovale, blanchâtre .La tige grêle, généralement droite dès la base, rude-pubérulente dans son tiers Inférieur, 1a 2 fois plus longue que les feuilles adultes. Les feuilles sont au nombre de 5-10, nulles ou très courtes à la floraison, puis allongées, dressées, étroitement, linéaires subaiguës, un peu en gouttière, lisses de couleur vert foncé. Au mois d'Août, les fleurs deviennent violacées jusqu'au mois d'octobre. Elles sont groupées en grappe courte puis allongée, à pédicelle ascendant, sans bractées, égalant le périanthe persistant long de 4-5 mm.

Les anthères sont noirâtres. Le fruit est une petite capsule, subglobuleuse-obtuse, à 2 graines par loge. La pollinisation est de type entomogame.

Elle apprécie les pelouses sèches ou les rochers, soit en terrain montagneux ou semi-montagneux, soit sur les côtes méditerranéennes et atlantique jusqu'à 700 m d'altitude du niveau de la mer.

Prospero autumnalis (L.) Speta, est l'une des dizaines d'espèces qui ont été décrites par Speta (1982). Elle a été aussi décrite dans la flore de l'Afrique du nord et de l'Algérie (Maire 1958).

I-4-2 Description botanique

Dans cette partie nous décrirons les différents organes constituant *Prospero autumnalis*.

Les feuilles sont basales dressées, larges de 2 mm, lisses. Elles sont situées à la base de la tige portant les fleurs, poussant parfois après les fleurs. Les fleurs situées au centre de la plante de couleur rose violacé sont groupées en grappe d'abord courtes et compactes puis lâches et allongées. Elles sont non bractéolées bisexuées de type 3. Elles n'ont qu'une seule enveloppe florale: 6 tépales libres, soudés à la base, violets, obtus, 6 étamines à anthères noirâtres, en 2 verticilles, 3 carpelles soudés en un ovaire supère à 3 loges. Les pédicelles ascendants, égalent le périanthe persistant long de 4-5mm. La tige est cylindrique grêle, dressée, et droite (figure 4). Le fruit est une petite capsule, subglobuleuse-obtuse; graines à 2 loges. Il est sec, déhiscent, s'ouvrant par des fentes en deux ou plusieurs valves, ou par des dents ou par des pores, contenant plusieurs graines à mode de dissémination barochore. Un bulbe petit, blanc, perdant lentement ses tuniques extérieurs ce qui fait que le plateau s'élève dans l'intérieure du bulbe et envoie dans toutes les directions des racines qui percent ses tuniques.



Figure4 : Morphologie de *Prospero autumnalis* (Amirouche ,2014).

Habitat : *Prospero autumnalis* pousse librement dans la nature sur des pelouses basophiles méso méditerranéennes, méso xérophiles.

I-4-3 Aire de répartition

Prospero autumnalis est distribué de l'Europe occidentale et la Méditerranée, Asie occidentale à Afrique. (L'abbé Coste ,2011) (figure5).

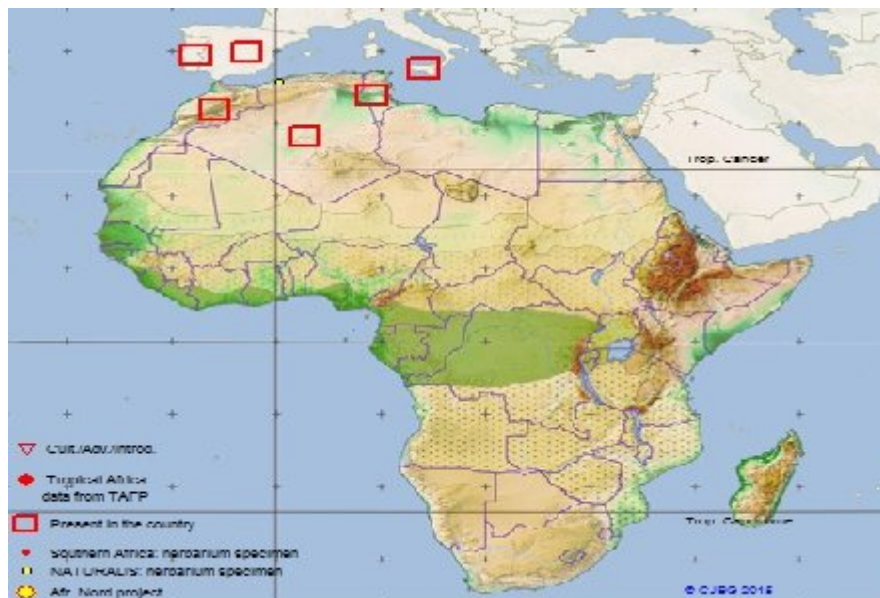


Figure5 : Distribution de l'espèce *Prospero autumnalis* (L.) Speta (1998) en Afrique (site African Flowering Plants Database).

I-4-4 Systématique

Prospero autumnalis est classé dans la systématique classique selon Cronquist (1981) comme suit :

Règne	: Végétal
Embranchement	: Spermaphytes
Sous embranchement	: Angiospermes
Classe	: Monocotylédones
Sous/ classe	: Liliidae
Ordre	: Liliales
Famille	: Liliaceae
Sous /Famille	: Hyacinthoideae
Genre	: <i>Prospero</i>
Espèce	: <i>Prospero autumnalis</i>

Nom binominal

Prospero autumnalis

(L.) Speta, 1982

Classification phylogénétique (APGIII, 2009)

En phylogénétique appartient à :

Ordre	: Asparagales
Famille	: Asparagaceae

I-5 Caryosystématique

Les Hyacinthaceae sont variables caryologiquement (Pfosser et Speta, 1999). Le dénombrement chromosomique de cette famille présente un complément chromosomique extrêmement variable avec un nombre de base $x=4, 5, 6,7$ et 8 avec plusieurs niveaux de ploïdie ($2n= 8, 10, 12, 14, 16, 26, 28, 42, 56, 70$) qui sont signalés dans diverses populations du bassin méditerranéen. Pour la sous-famille des Hyacinthoideae le nombre ancestral de base est de $x=9$ (Brullo *et al.*, 2009).

II Les polyphénols

Les composés phénoliques (CP), sont des molécules du métabolisme secondaire spécifiques du règne végétal.

Cette appellation générique désigne un vaste ensemble de substances aux structures variées qu'il est difficile de définir simplement (Bruneton, 1999).

A l'heure actuel, plus de 8000 molécules ont été isolées et identifiées (Tao et Lambert, 2014).

Ils ont tous en commun la présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles qui peuvent être libres ou engagées (Roberds, 2003 ; Hennebelle *et al.*, 2004), avec ou non d'autres fonction alcoolique (OH), carboxylique (COOH),...).

II-1 LES Différentes familles de composés phénoliques

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en une dizaine de classes (Harborne, 1990 ; Macheix *et al.*, 2006) qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C₆ à des formes très polymérisées), ensuite par le degré de modifications de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation...) enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, autres molécules secondaires pouvant être ou non des composés) (Macheix *et al.*, 2006).

Selon Harborne (1993), les composés phénoliques se répartissent dans différentes familles : anthocyanes, coumarines, lignines, flavonoïdes, tanins, quinones, acides phénols, xanthonnes. Ce sont des monomères, des polymères ou des complexes dont la masse moléculaire peut atteindre 9000.

Dans le tableau 2 sont citées les principales classes des composés phénoliques.

Tableau2 : Les principales classes des composés phénoliques (Macheix *et al.*, 2006).

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine (exemples)
C ₆	Phénol simple	Catéchol	Nombreuses espèces
C ₆ -C ₁	Acides Hydroxybenzoïques	p-hydroxybenzoïque	Epices, fraise
C ₆ -C ₃	Acides	Acide caféique	Pomme de terre

	Hydroxycinnamiques Coummarines	Acide férulique. Scopolétine	Pomme Citruc
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones	Juglone	Noix
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes	Resvératrol	Vigne
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes <ul style="list-style-type: none"> • Flavonols • Anthocyanes • Flavanols • Flavanones Isoflavonoïdes	Kaempférol, quercétine Cyanidine, pélarгонidine Catéchine, épicatéchine Naringénine Daidzéine	Fruits, légumes, Fleurs Fleurs, fruits rouges Pomme, raisin Citrus Soja, pois
(C ₆ -C ₂) ₂	Lignanes	Pinorésinol	Pin
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines		Bois, noyau des fruits
(C ₁₅)	Tannins		Raisin rouge, kaki

II-2 Les Flavonoïdes

Selon la figure 6 les flavonoïdes sont formés d'un squelette à 15 atomes de carbones (C₆.C₃.C₆) ; correspond à la structure du diphenyle propane (Santos-Buelga et Scalbert, 2000). Il comprend à lui seul plus de 6000 molécules regroupées en sous classes (Ribereau-Gayon, 1968 ; Macheix *et al.*, 2006).

Les flavonoïdes sont des pigments quasiment universels des végétaux. Ce sont des substances généralement colorées très répandues chez les végétaux. On les trouve dissoutes dans les vacuoles à l'état d'hétérosides ou comme des constituants de plastes particuliers, des chromoplaste. Presque toujours hydrosolubles. Ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Tel est les cas des flavonoides jaunes (chalcones, flavanols Jaunes), des anthocyanosides rouges, bleus ou violets.

Il reste des milliers d'autres composés à découvrir puisque le squelette des flavonoïdes peut être substitué par différents groupements hydroxy, méthoxy, méthyl, benzyl et isoprényl (Becheer, 2003).

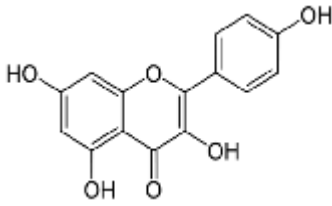


Figure 6 : Structure générale des flavonoïdes (Bruneton, 1999).

II-3 Localisation et rôle des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont présents dans les vacuoles des cellules, participent aux réactions de défense face à différents stress biotiques ou abiotiques (pathogènes, rayonnements UV....) et contribuent à la qualité organoleptique des aliments issu des végétaux (couleur, astringence, arôme, amertume). Leur répartition tant qualitative que quantitative dans la plante varie selon les espèces, les organes, les tissus ou encore les différents stades de développement (Robards *et al.*, 1999 ; Gresele *et al.*, 2011).

Se sont des composés très hétérogènes tant par leur composition que par leur structure. Pendant longtemps, ces composés ont été considérés comme secondaires et métaboliquement inactifs, ils ne suscitaient donc que peu d'intérêt. A l'heure actuelle, cette opinion a changé, du fait de nombreuses recherches qui ont largement montrées que ces composés ne sont pas inertes et contribuent efficacement dans la biosynthèse de divers métabolites de l'organisme.

Chez les végétaux, ils sont soumis à d'importantes variations quantitatives et qualitatives, ce qui témoigne d'une dynamique biochimique incontestable. Ils interviennent dans des processus vitaux les plus divers. D'où l'importance croissante des études consacrées à ces composés (Moulti-Mati et Kebbab, 2014).

II-4 Propriétés physico-chimiques

*Les propriétés physiques

Les polyphénols sont solubles dans les solvants organiques polaires, par contre leurs formes hétérosidiques sont solubles dans l'eau (Bruneton, 1993).

***Les propriétés chimiques**

Tous les composés phénoliques sont instables et sont facilement oxydables, surtout en milieu alcalin (Bruneton, 1993).

Les propriétés chimiques des phénols sont dues : d'une part aux propriétés propres au groupement OH qui sont affectées par la présence d'un cycle benzénique, d'autre part aux propriétés de ce cycle qui sont elles même influencées par la présence d'un ou de plusieurs groupements OH.

L'étude des phénols implique donc l'étude de l'influence mutuelle de la fonction phénol et du cycle benzénique (Ribereau-Gayon, 1968).

II-5 Domaines d'application des composées phénoliques

***Application pharmacologique**

Les composés phénoliques sont souvent anti-inflammatoires. Ils peuvent être anti-allergiques (Bruneton, 1993).

Les flavonoïdes ont une propriété «vitaminique p» potentiellement veino actifs ; ils diminuent la perméabilité des capillaires sanguins et renforcent leur résistance (Bruneton, 1993). Les flavonoïdes ont aussi un effet anti-hémorragique dans le scorbut et un effet anti-spasmodique (Delaveau, 1988).

Selon Perrin (1992), les polyphénols contenus dans les fruits et les légumes réduiraient le risque de certains cancers, ils assurent aussi une protection contre l'athérosclérose.

***Application agro-alimentaire**

La vanilline, abondamment utilisée dans l'industrie agro-alimentaire à la place de la vanille et des extraits de vanille, est actuellement synthétisée à partir des phénols, elle peut aussi être obtenue à partir des lignines matière première abondante et peut coûteuse (Bruneton, 1993).

La grande oxydabilité de certains phénols permet de les utiliser comme anti-oxydant, pour protéger l'oxydation des huiles et des graisses (Ribereau-Gayon, 1968).

***Application en chimiotaxonomie**

Les caractères morphologiques ne sont pas les seuls à être pris en compte pour la détermination et la classification des végétaux. Les caractères chimiques sont également utilisés depuis longtemps pour la classification des espèces végétale. Mais cette chimiotaxonomie ne s'est réellement développée que depuis les progrès de la biochimie

végétale. Parmi les marqueurs utilisés nous pouvons citer les composés phénoliques (Ribereau Gayon, 19868).

Selon Ait Aneur (1999), les flavonoïdes sont de bons marqueurs taxonomiques. Grace à leur bonne stabilité ils constituent des caractères héréditaires dotés d'une diversité structurale très forte (double liaison, substituant variés, etc.).

Ils sont non seulement des marqueurs qui discriminent les différents groupes de végétaux mais aussi un outil d'interprétation des rapports évolutifs entre ces groupes (Chehrit, 1995).

II-6 Utilisations des acides phénoliques par la plante

Les composés phénoliques sont utilisés par la plante comme moyen de défense contre les agressions pathogènes :

- Les acides phénols sont anti-bactériens et antifongique, en particulier à l'égard des organismes phytopathogènes. Parmi ces acides, les dérivés de l'acide caféique sont des précurseurs de tanins qui en s'oxydant peuvent former des quinones fortement fongitoxiques (Bruneton, 1993).
- Les lignines peuvent renforcer la paroi cellulaire lors de l'infection. Elles réduisent aussi la quantité d'eau pénétrant à travers les tissus conducteurs de la sève brute (xylème et bois) en les rendant plus résistant aux attaques microbiennes (Cambel, 1993).
- Les flavonoïdes jouent un rôle dans la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement ultraviolet (Bruneton, 1993 ; Richter, 1993).

I Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est constitué de feuilles et de bulbes de deux populations de scille d'automne qui proviennent de la région de Kabylie.

I-1 Station d'échantillonnage

L'échantillonnage de *Prospero autumnalis* et *Hyacinthoides aristides* a été effectué en automne dans un verger d'Olivier (*Olea europea*) où les plantes étaient en floraison, sous un bioclimat Subhumide. La zone de prélèvement est située à 300 m d'altitude environ dans la région de Tizi-Rached

I-1-1 Les feuilles

Après échantillonnage les feuilles ont été séchées à l'ombre et à l'abri de l'humidité et sont stockées soigneusement.

Elles sont ensuite coupées et broyées à l'aide d'un broyeur électrique à couteau, afin d'obtenir une poudre végétale, qui sera utilisée pour l'extraction des différents composés phénoliques (figure 7).



Figure 7 : Feuilles de *Hyacinthoides aristidis* séchées et coupées.

I-1-2 Les bulbes

Les bulbes récoltés ont été d'abord débarrassés de leurs pellicules. Après séchage à une température ambiante les bulbes sont coupés et broyés (Figure 8 et 9). La poudre obtenue servira à la préparation des extraits.



Figure8 : Bulbes de *Hyacinthoide aristidis* séchés et coupés.



Figure9: Bulbes de *Prospero autumnalis* séchés et coupés.

II Méthodes

II-1 Etude morphologique

Un caractère taxonomique peut être déterminé morphologiquement pour classer les espèces végétales. L'analyse de la variabilité morphologique permet de viser l'impact des différents facteurs sur la stabilité de ces caractères. L'étude morphologique des deux populations est effectuée par les mesures morphométriques des caractères de l'appareil végétatif (feuilles et bulbes) et des caractères de l'appareil reproducteur (Fleur) à l'aide de papier millimétré (Tableau 3).

Tableau 3 : Caractères morphologiques mesurés chez les deux espèces de Hyacinthacées.

Symboles	Caractères
LOF	Longueur de la feuille
LAF	Largeur de la feuille
NF	Nombre de feuilles
DB	Diamètre du bulbe

LPN	Longueur de la hampe florale
LIF	Longueur de l'inflorescence
LPF	Longueur du pédoncule floral
NFL	Nombre de fleurs

- **Test statistique :** Les résultats obtenus sont soumis à la comparaison de moyennes par le test de student à $p=0.05$ (Tableau5).

II-2 Extraction des flavonoïdes par hydrolyse acide

Notre étude repose sur l'analyse biochimique de 3 classes de flavonoïdes : **les C-glycosides, les Anthocyanes et les aglycones flavoniques** qui sont extraites à partir du matériel végétal sec pulvérisé (figure 10 et 11).



Figure 10 : Poudres végétales de *Hyacinthoides aristidis*.



Figure 11 : Poudres végétales de *Prospero autumnalis*.

L'hydrolyse acide a été mise au point par Bate-Smith (1954), puis par Lebreton (1967) puis par Jay *et al.* (1975) et enfin améliorée par Laracine (1984). Cette technique est destinée à la séparation et l'extraction des flavonoïdes par hydrolyse acide à chaud de la poudre végétal (la liaison C-O-C des O-glycosyl-flavonoïdes est très fragile et se rompt à l'hydrolyse acide en libérant les aglycones ; par contre la liaison C-C des C-glycosylflavonoïdes est très résistante à ce type d'hydrolyse) et permet d'obtenir deux types de composés :

- Une fraction d'**aglycones** et d'acides phénols par l'extraction préliminaire à l'éther diéthylique.
- Une fraction de **C-glycosides** et d'**anthocyanes** récupérée par extraction au n butanol.

II.3 Protocole expérimental :

Un échantillon de 0.5g de poudre végétale est hydrolysé par 40 ml d'HCL (2N) au bain marie bouillant pendant 40min avec insufflation d'air toutes les 10min. L'oxygène permet l'oxydation des proanthocyanidines en anthocyanidines correspondantes (figure12).



Figure12 : Insufflation toutes les 10min.

A chaque extraction deux phases apparaissent, l'une supérieure dite épiphase et l'autre inférieure dit hypophase (Figure13).

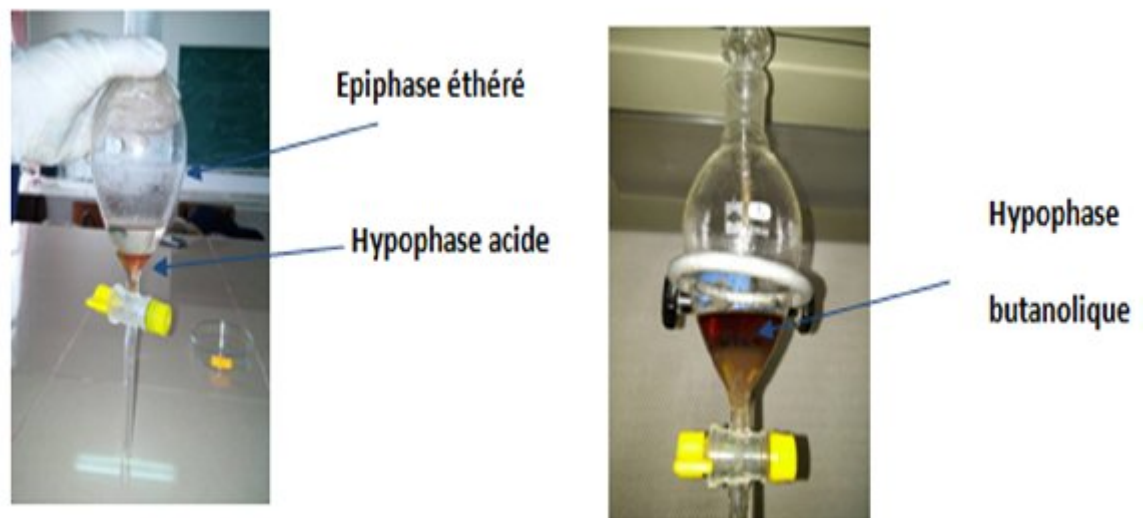


Figure13: Phases d'extraction des flavonoïdes.

Epiphase étherée

Elle est de couleur jaune verdâtre. Elle contient les aglycones (flavones et flavonols) et les acides phénols. Elle est récupérée après chacune des extractions dans un bécher et évaporée à l'aire libre. Le résidu sec est repris dans 5ml d'éthanol, puis conservé au frais avant d'être soumis à une analyse quantitative par spectrophométrie.

Hypophase acide

Elle est de couleur rougeâtre. Elle contient les anthocyanes, les C-glycosides et les oses simples. Elle est récupérée et additionnée à 35ml de n-butanol, remise dans une ampoule à décanter. Le n-butanol forme dans l'hypophase une épiphase rougeâtre butanolique qui va être récupérée dans une boîte de pétri.

Le résidu sec est repris dans 5ml de méthanol. Les extrais obtenus sont conservé par la suite au frais avant d'être soumis à une analyse quantitative par spectrophotométrie (figure14).



Figure14 : Extraits flavonoïques obtenus.

La technique d'hydrolyse acide est résumée dans la figure 15.

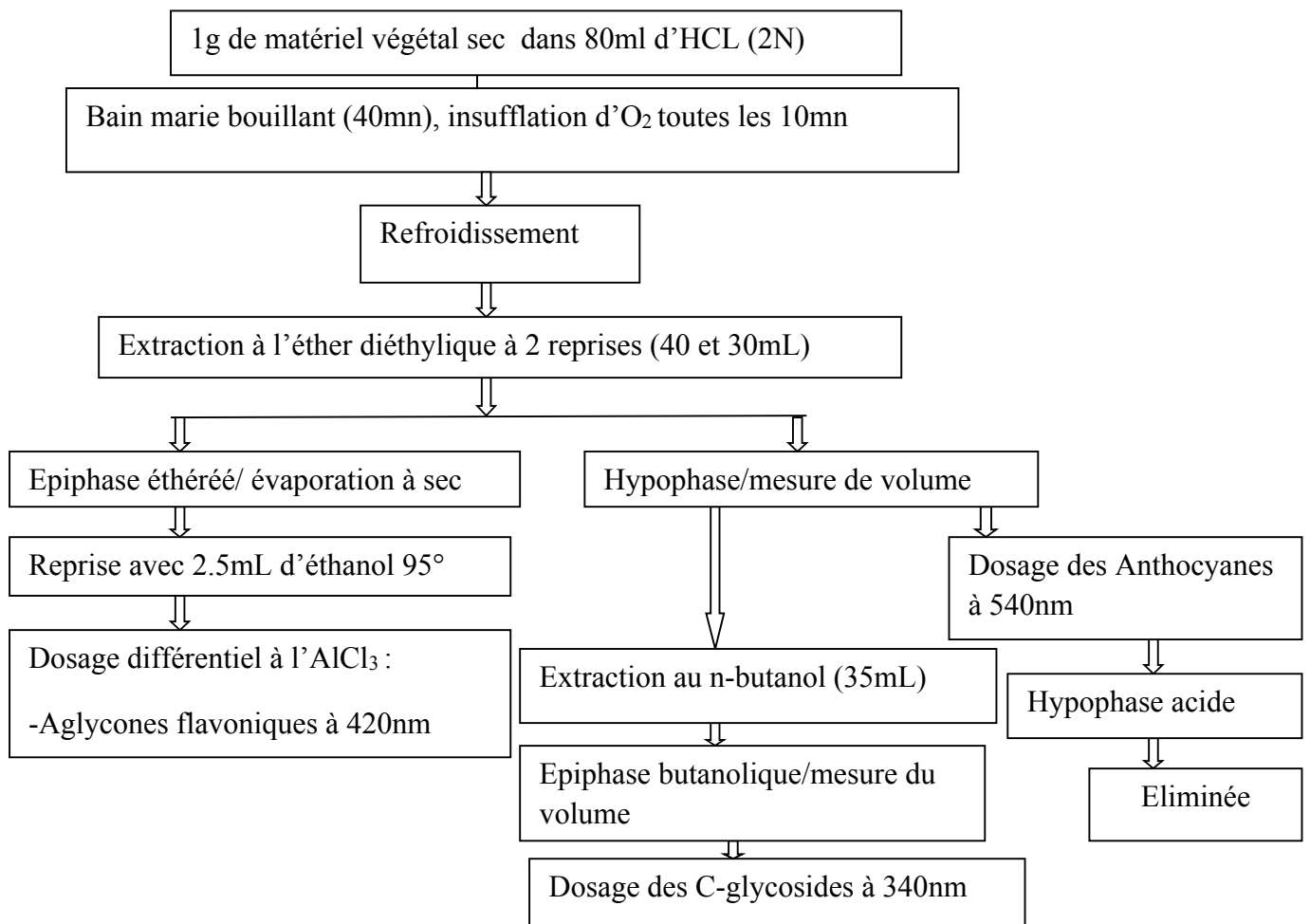


Figure15 : Protocol d'analyse général des flavonoïdes (Lebreton *et al.*, 1967).

II-4 Analyses quantitatives

L'analyse quantitative est basée sur l'utilisation de la méthode de colorimétrie qui est basée sur la propriété de certains composés qui absorbent d'avantage la lumière à des longueurs d'ondes spécifiques dans le spectrophotomètre (Plummer, 1989) ; elle permet de réaliser des dosages grâce à loi de Beer Lambert dont le principe est le suivant :

Lorsqu'une lumière d'intensité I_0 passe à travers une solution, une partie de celle-ci est absorbée par le (s) soluté (s). L'intensité I de la lumière transmise est donc inférieure à I_0 . L'absorbance de la solution est définie comme suit :

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right)$$

a) Dosage des proanthocyanes

La lecture des extraits s'établit par spectrophotomètre à 520nm juste après extraction car elle se dégrade rapidement à la lumière. La teneur absolue en anthocyanes est calculée par la formule suivante dont le coefficient correctif, est égal à 6 (Lebreton *et al.*, 1967).

$$T \text{ (mg/g)} = 5,2 \cdot 10^{-2} \cdot DO \cdot V \cdot d / p$$

DO : densité optique

V : volume de la phase méthanoïque

d : facteur de dilution

p : poids sec du matériel végétal hydrolysé

b) Dosage des C-glycosylflavones

La lecture des extraits s'établit également par spectrophotométrie à 340nm et la teneur absolue est exprimée en Orientine et calculée par la formule suivante :

$$T \text{ (mg/g)} = 2,37 \cdot 10^{-2} \cdot DO \cdot V \cdot d / p$$

DO : densité optique

V : volume de la phase la phase méthanoïque

d : facteur de dilution

p : poids sec du matériel végétal hydrolysé

c) Dosage des aglycones flavoniques

Les flavonoïdes ayant un hydroxyle (-OH) libre en position 3 et 5 réagissent avec les métaux. Le chlorure d'aluminium (AlCl_3) forme un complexe avec les flavones et/ou les flavonols. Pour déterminer la teneur en aglycones, on utilise la méthode du dosage différentiel, qui est basé sur deux dilutions :

- La 1^{ère} dilution se fait dans de l'éthanol (extrait étheré+ éthanol 95°).
- La 2^{ème} dilution se fait dans la solution d' AlCl_3 (extrait étheré+ AlCl_3 dans l'éthanol 95°).
- La solution d' AlCl_3 est préparée par le mélange de 1g de chlorure d'aluminium dans 100ml d'éthanol 95°.

A partir du résidu sec étheré repris dans de l'éthanol à 95° et d'autre part avec du chlorure d'aluminium à 1%, après réaction pendant 15min, la lecture des aglycones se fera entre 400 et 435nm au spectrophotomètre.

Concernant le dosage des Aglycones flavoniques (420nm) et des flavonols (435nm), la formule utilisée est la suivante :

$$T (\text{mg.g}^{-1}) = 1,3 \times 10^{-2} \times \Delta \text{DO} \times V \times \frac{d}{P}$$

- ΔDO : densité optique au pic différentiel égale à $\text{DO} (\text{AlCl}_3) - \text{D.O} (\text{éthanol } 95^\circ)$
- ϵ : coefficient d'absorption de la Quercétine égale à 302g
- V : volume de la solution éthanolique
- d : facteur de dilution
- p : poids sec du matériel végétal hydrolysé en g

II.5 Essai d'élaboration des caryotypes des deux espèces

Le niveau de ploïdie est établi par comptage chromosomiques au stade métaphase de la mitose des méristèmes racinaires.

Le protocole expérimental est celui est celui établi par Jahier et al. (1992). Il permet d'observer et de dénombrer les chromosomes métaphasiques. Ce protocole est décrit ci-dessous.

➤ Prétraitement

Les pointes racinaires ont été coupées directement à partir des bulbes après le prélèvement des échantillons. Les bulbes sont débarrassés des racines préexistantes puis mis à germer dans l'eau jusqu'à la poussée des racines après quelques jours (Figure16).

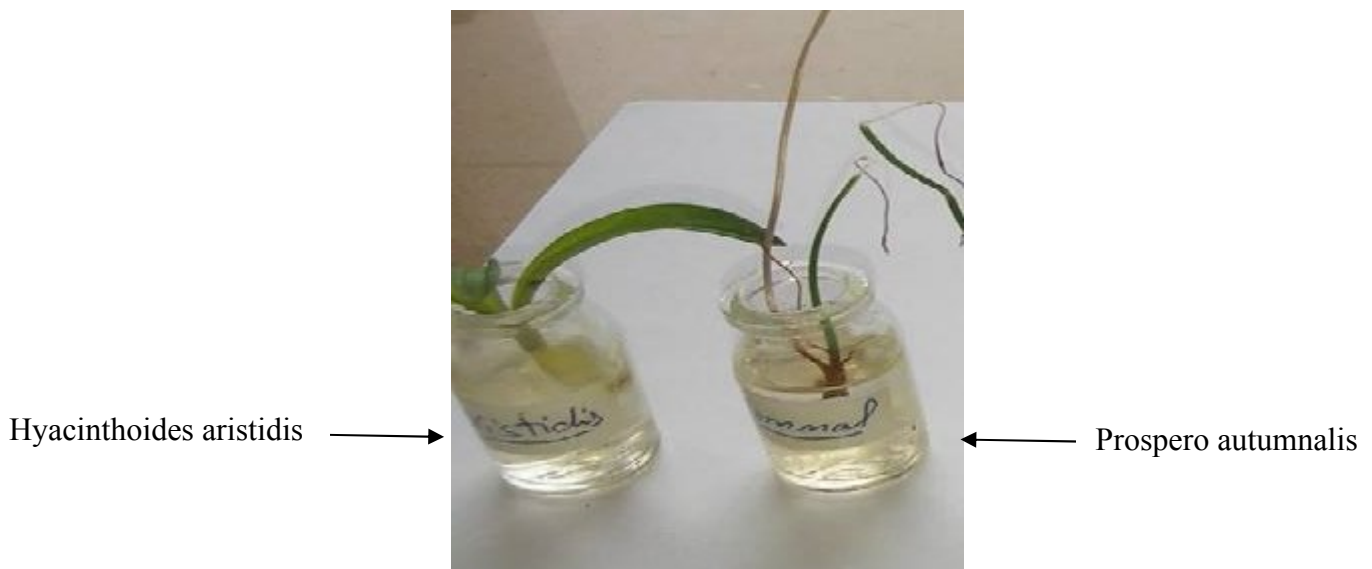


Figure16 : Rhizogenèse à partir des bulbes de *Hyacinthoides aristidis* et *Prospero autumnalis*.

Après apparition des radicules, ces dernières sont sectionnées une fois qu'elles ont atteint une longueur de 0.5 et à 1 cm. Elles sont ensuite prétraitées par immersion dans une solution de 8-hydroxyquinoline ou α -bromonaphtalène (agents mitoclasiques.), Tableau 4.

Tableau4 : Prétraitement par deux agents mitoclasiques.

Prétraitement	But	Durée
α -bromonaphtalène	-Inhiber la formation du fuseau achromatique. -bloquer les mitoses au stade métaphase.	2h à température ambiante
8-hydroxyquinoline	-bloquer les divisions cellulaires au stade métaphase.	4h à température ambiante ou 24h au froid (4°)

➤ **Rinçage**

Avec de l'eau distillée pour éliminer l'excès de l'agent mitoclasique.

➤ **Fixation**

Les racines sont ensuite fixées dans un mélange alcool-acide acétique (3 : 1 v/v) pendant 24h à 4° ou bien à température ambiante. Le fixateur détruit toute vie cellulaire. Il doit avoir une action rapide pour bloquer les divisions cellulaires et maintenir l'intégrité structurale des chromosomes.

➤ **Stockage et Conservation**

Les racines germées ont été stockées dans l'alcool 70° à froid, elles peuvent être conservés pendant une longue période.

➤ **Hydrolyse**

Après rinçage à l'eau distillée, les pointes racinaires sont plongées dans une solution d'acide chlorhydrique (HCl 1N) à 60° pendant 5mn pour subir une hydrolyse. Cette hydrolyse a pour but de ramollir les méristèmes, de rompre des liaisons glucidiques des bases puriques et de libérer les groupements aldéhydes de l'ADN. Elle facilite, par ailleurs, l'écrasement et l'étalement des cellules et des chromosomes entre lames et lamelle.

➤ **Coloration**

La coloration est réalisée selon la technique de Feulgen et Rossenbeck (1914). Les extrémités racinaires sont colorées au carmin acétique durant 1h à 3h à l'obscurité et à température ambiante. Les groupements aldéhydes libérés par l'hydrolyse, mis en présence du carmin acétique, donnent une couleur rose aux chromosomes.

➤ **Montage et observation**

Après rinçage à l'eau (pour éliminer l'excès du colorant), les extrémités racinaires colorées en rouge vif, sont montées entre lames et lamelles, dans une goutte de carmin acétique ou bien dans l'acide acétique à 45% pour augmenter le contraste entre les chromosomes et le cytoplasme. Ensuite nous réalisons des squashes qui consistent à écraser les préparations à l'aide du manche d'une aiguille lancéolée.

Les observations sont faites au microscope photonique au grossissement 40×10. (Les meilleures préparations sont celles qui présentent des chromosomes bien individualisés).

I Variabilité morphologique des deux espèces *Prospero autumnalis* et *Hyacinthoides aristidis*

Les délimitations et les relations interspécifiques sont abordées à travers une étude de la variation morphologique des populations naturelles.

Les mesures de 8 caractères biométriques quantitatifs ont été effectuées sur 10 individus de chaque espèce naturelle.

La matrice de données brutes concernant les longueurs, les largeurs, le diamètre du bulbe et le nombre de fleurs sont regroupés dans les tableaux 1 et 2 (annexe1), ceci a fait l'objet de l'étude de la variabilité morphologique.

I-1 Comparaison des moyennes des différents caractères étudiés

Les différences entre les moyennes des caractères morphologiques étudiés, au sein de chacune des deux populations sont données dans le Tableau 5 et matérialisés par le graphe de la figure 17.

Tableau 5: Moyenne \pm écarts types de caractères des 2 populations étudiées.

Pop Caractères	Pop1	Pop2
LOF	4.89 \pm 1.71	6.44 \pm 1.37
LAF	0.15 \pm 0.07	0.85 \pm 0.21
NF	2.50 \pm 0.50	3.60 \pm 0.49
DB	1.39 \pm 0.23	0.92 \pm 0.35
LNP	17.79 \pm 3.08	8.38 \pm 1.79
NIF	4.81 \pm 1.94	1.23 \pm 0.76
LPF	1.08 \pm 0.30	0.40 \pm 0.14
NFL	7.70 \pm 2.87	8.40 \pm 3.93

Les mesures des 8 caractères effectués soumises au test T (test student) ont montrés que les mesures de la longueur effectuées sur les feuilles des 2 populations n'ont montré aucune différence significative à P=5%. Quant aux largeurs des feuilles, elles ont montré des différences très hautement significative à P=0.1%.

Le nombre de feuilles dénombrés dans le cas des 2 espèces de Hyacinthaceae a montré une différence très hautement significative à P=0.001.

joutons à cela des différences très hautement significative révélées entre les 2 populations concernant le diamètre des bulbes, la longueur de la hampe florale, la longueur de l'inflorescence ainsi que celle du pédoncule floral est ce à $P < 0.001$.

Le caractère nombre de fleurs chez les 2 populations n'a montré aucune différence significative à $P = 5\%$.

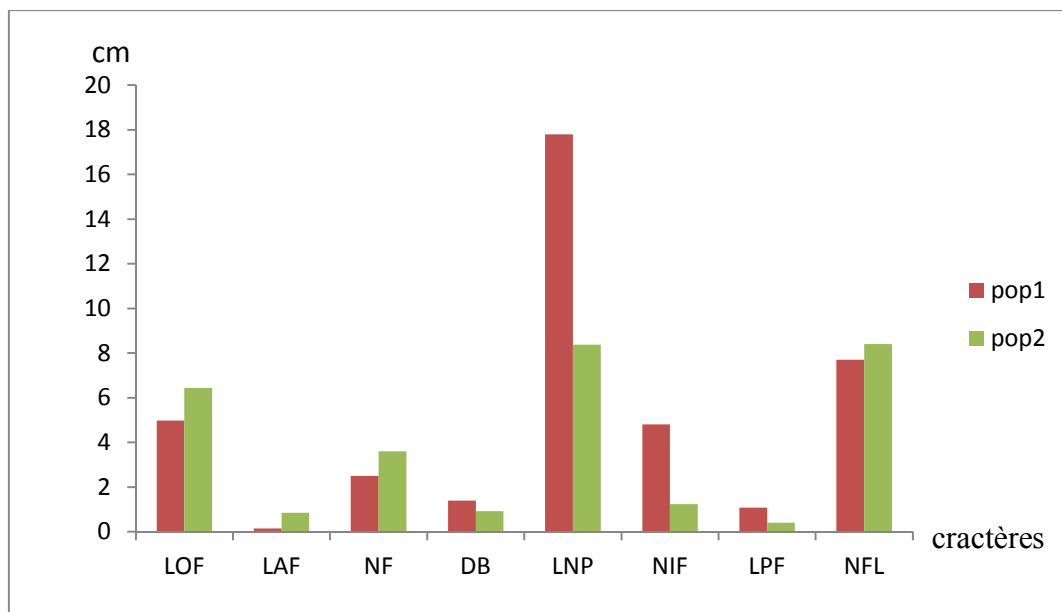


Figure17 : Moyennes des 8 caractères des 2 populations mesurés chez *Prospero autumnalis* et *Hyacinthoides aristidis*.

Les longueurs, les largeurs des feuilles et le nombre des feuilles et des fleurs sont plus important chez *Hyacinthoides aristidis* que chez *Prospero autumnalis*, alors que la longueur de la hampe florale, de l'inflorescence et du pédoncule florale ainsi que le diamètre du bulbe est plus élevé chez *Prospero autumnalis* que chez *Hyacinthoides aristidis*.

II Etude comparative de la composition en flavonoïdes entre les feuilles et les bulbes.

II-1 Population 1 *Prospero autumnalis*

Les résultats du tableau 6 nous montrent que la population de *Prospero autumnalis* présente des teneurs plus élevées en c-glycosides avec une moyenne 0.150 ± 0.024 mg/g puis les anthocyanes avec une moyenne de 0.0883 ± 0.064 mg/g puis viennent les aglycones avec une moyenne de 0.007 ± 0.0101 mg/g.

Tableau6 : Moyennes \pm écarts types des teneurs absolues en trois classes flavonoïdes des deux organes (feuilles et bulbes) de la population 1 *Prospero autumnalis*.

Teneurs Organes	Aglycones (mg/g)	Anthocyanes (mg/g)	c-glycosides (mg/g)
Feuilles	0.015	0.134	0.168
Bulbes	0.0007	0.0427	0.133
Moyennes	0.007	0.0883	0.150
Ecarts types	0.0101	0.064	0.024

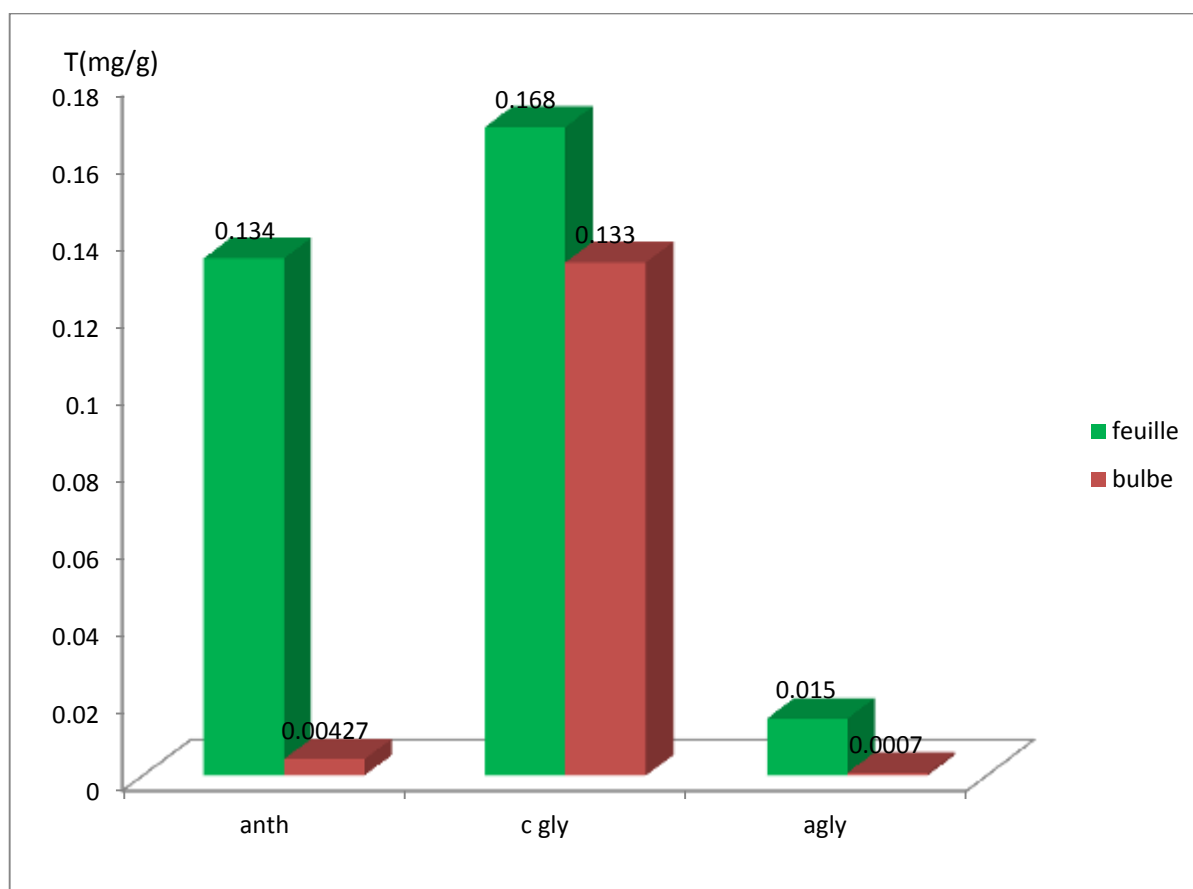


Figure18 : Moyennes des teneurs absolues des trois classes de flavonoïdes étudiées des feuilles et des bulbes de la population 1 (*Prospero autumnalis*).

Les feuilles de *Prospero autumnalis* renferment des quantités importantes en anthocyanes (0.134mg/g) et en c-glycosides (0.168mg/g). Ces quantités sont plus importantes que celles contenues dans les bulbes avec respectivement 0.0427mg/get0.133mg/g d'anthocyanes et c-glycosides quant aux anthocyanes et aglycones, elles ont brillé par leur faible présence dans les bulbes.

II-2 Population 2 *Hyacinthoides aristidis*

La lecture des résultats du tableau 7 montre que les anthocyanes et les c-glycosides sont présentes en quantités élevées dans les feuilles avec respectivement 0.059 mg/g et 0.142mg/g alors que les aglycones ne représentent que 0.004mg/g.

Tableau7 : Moyennes± écarts types des teneurs absolues en trois classes flavonoïdes de deux organes (feuilles et bulbes) de la population 2 *hyacinthoides aristidis*.

Teneurs Organe	Aglycones (mg/g)	Anthocyanes (mg/g)	c-glycosides (mg/g)
Feuilles	0.004	0.09	0.084
Bulbes	0.004	0.053	0.034
Moyennes	0.004	0.143	0.059
Ecart types	0	0.026	0.035

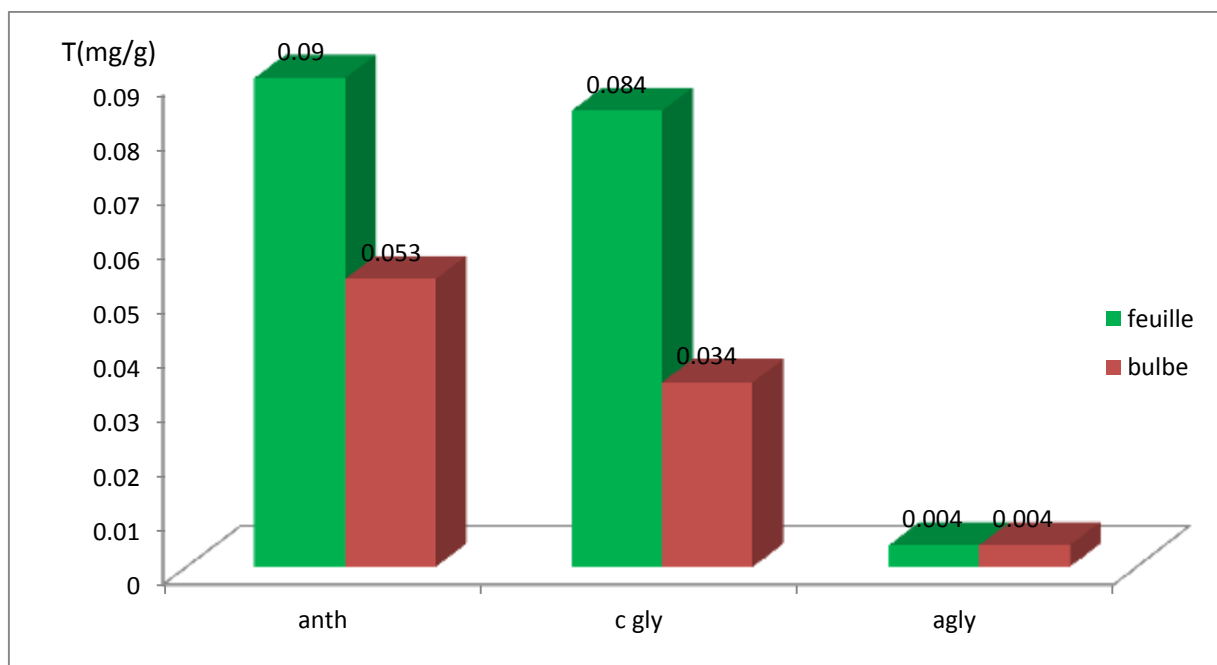


Figure19 : Moyenne des teneurs absolues des trois classes de flavonoïdes étudiés des feuilles et des bulbes de la population 2 (*Hyacinthoides aristidis*).

La figure 19 montre les résultats des teneurs absolues des substances flavonoïques de deux organes étudiés (feuilles, bulbes) au sein de la population *Hyacinthoides aristidis*, les feuilles sont les plus riches en anthocyanes et c-glycosides (0.009,0.0084 mg/g), par rapport aux bulbes (0.053,0.034mg/g), tandis que leurs teneurs en aglycones sont faible et elles sont la même que dans les feuilles et les bulbes (0.004mg/g).

III Etude comparative en composés flavonoïque entre la population 1 et 2 (*Prospero autumnalis* et *Hyacinthoides aristidis*)

Les teneurs des composés flavonoïques déterminés dans les deux organes (feuilles et bulbes) des deux populations (*Prospero autumnalis* et *Hyacinthoides aristidis*) sont regroupés dans le tableau 8.

A) Teneurs en aglycones

L'étude comparative des résultats obtenus à partir du tableau 8 nous révèle que les feuilles de *Prospero autumnalis* et *Hyacinthoides aristidis* recèlent des quantités différentes en aglycones. La population de *Prospero autumnalis* a montré une quantité plus importante avec 0.015mg/g comparativement à la population *Hyacinthoides aristidis* avec 0.004mg/g alors que les bulbes de *Prospero autumnalis* renferment moins d'aglycones (0.0007mg/g) que *Hyacinthoides aristidis* (0.004mg/g).

Tableau8 : Teneurs en aglycones dans les deux organes (feuilles et bulbes) des deux populations (*Prospero autumnalis* et *Hyacinthoides aristidis*).

Organes	Feuilles (mg/g)	Bulbes (mg/g)
Populations		
Pop1 (prospero)	0.015	0.0007
Pop2 (aristidis)	0.004	0.004
La moyenne	0.0095	0.0024
Ecart types	0.007	0.0023

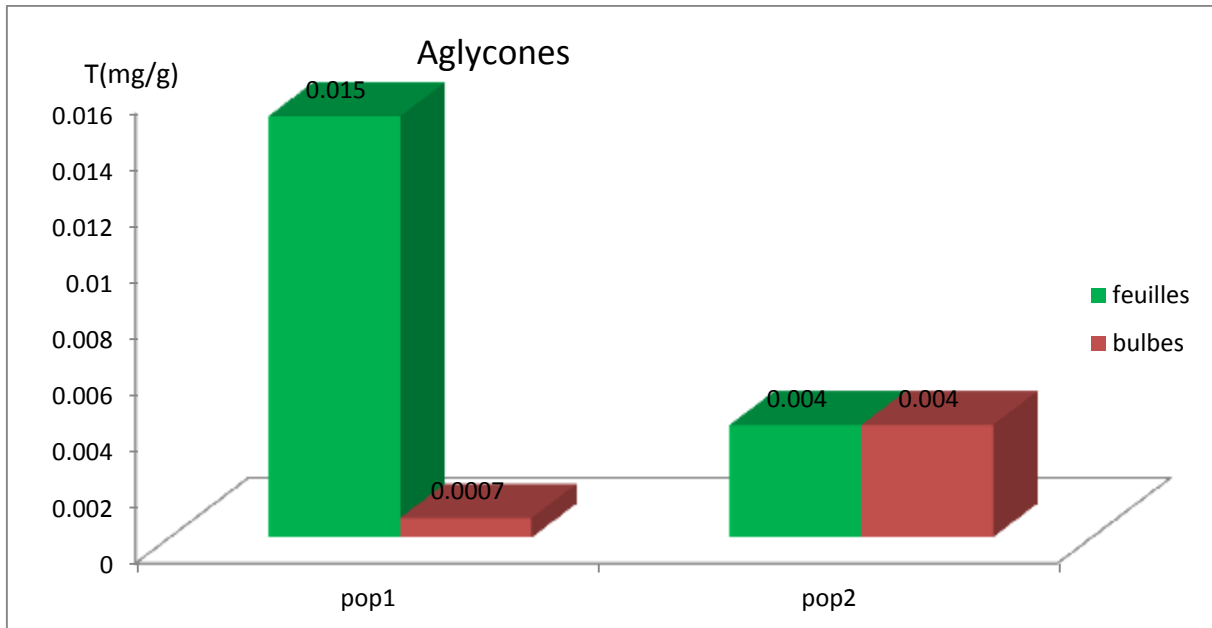


Figure20 : Teneurs en aglycones dans deux organes (feuilles, bulbes) de deux populations (*Prospero autumnalis* et *Hyacinthoides aristidis*)

La figure 20 montre les teneurs absolues en aglycones dans les deux organes (feuilles et bulbes) au sein de deux populations de Hyacinthacees (*Prospero autumnalis* et *Hyacinthoides aristidis*). Les feuilles de la population de *Prospero autumnalis* plus riche en aglycones que celle de la population de *Hyacinthoides aristidis*. Cependant le bulbe de *Hyacinthoides aristidis* et le plus riche en aglycones que celui de *Prospero autumnalis*.

B) Teneur en anthocyanes

Le tableau 9 nous montre que les feuilles de *Prospero autumnalis* et *Hyacinthoides aristidis* recèlent des quantités différentes en anthocyanes. La population de *Prospero autumnalis* a montré une quantité plus importante avec 0.134mg/g comparativement à la population *Hyacinthoides aristidis* avec 0.090mg/g alors que les bulbes de *Prospero autumnalis* renferment moins d'anthocyanes (0.0427mg/g) que *Hyacinthoides aristidis* 0.053mg/g.

Tableau9 : Teneurs en anthocyanes dans les deux organes (feuilles et bulbes) de deux population (*Prospero autumnalis* et *Hyacinthoides aristidis*).

Organes	Feuille (mg/g)	Bulbe (mg/g)
Populations		
Pop1 (prospero)	0.134	0.0427
Pop2 (aristidis)	0.090	0.053
La moyenne	0.112	0.047
Ecart type	0.031	0.007

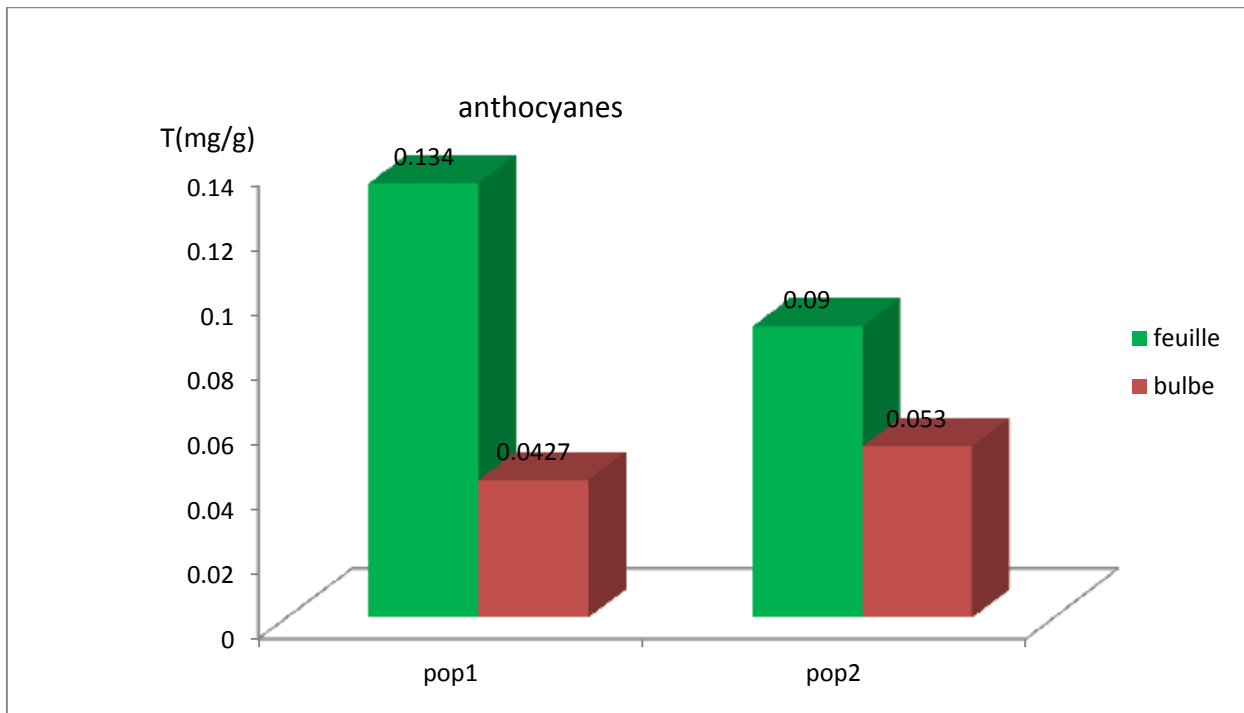


Figure21 : Teneurs en anthocyanes dans deux organes (feuilles, bulbes) de deux populations (*Prospero autumnalis* et *Hyacinthoide aristidis*).

D'après les résultats de la figure 21 nous remarquons que les teneurs en anthocyanes dans la partie feuille de la population *Prospero autumnalis* est plus élevée par rapport aux teneurs des feuilles de la population *Hyacinthoides aristidis*. Pour la partie bulbe la population de *Hyacinthoides aristidis* qui est la plus riche en anthocyanes que *Prospero autumnalis*.

C) Teneur en C-glycosides

La lecture des résultats du tableau 10 montre que les quantités des c-glycosides dans les feuilles de *Prospero autumnalis* (0.168mg/g) et plus élevée que celle de *Hyacinthoides aristidis* (0.084mg/g) ainsi que dans les bulbes de *Prospero autumnalis* renfermant une quantité de c-glycosides de (0.133mg/g) et *Hyacinthoides aristidis* (0.034mg/g).

Tableau10 : Teneurs en c-glycosides de deux organes (feuilles, bulbes) de deux populations

Organes	Feuilles (mg/g)	Bulbes (mg/g)
Populations		
Pop1 (<i>Prospero autumnalis</i>)	0.168	0.133
Pop2(<i>Hyacinthoidesaristidis</i>)	0.084	0.034
La moyenne	0.126	0.083
Ecart type	0.059	0.070

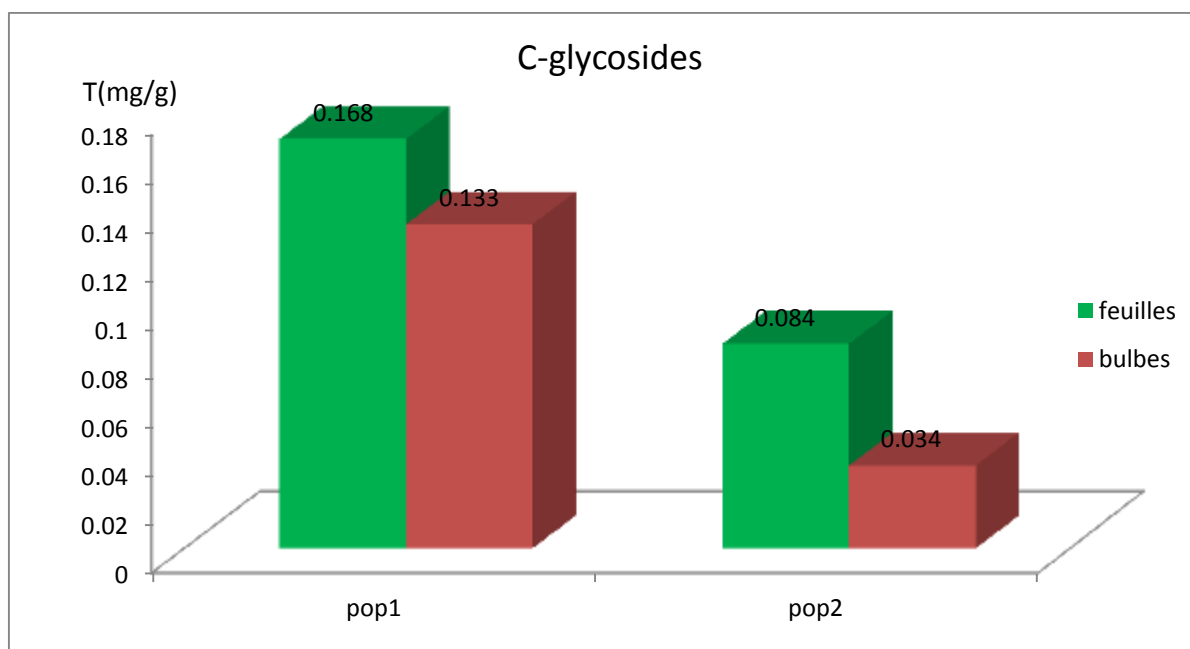


Figure22 : Teneurs en c-glycosides dans deux (feuilles, bulbes) de deux populations (*Prospero autumnalis* et *Hyacinthoides aristidis*)

La figure22 nous indique que les organes feuilles et bulbes de la population de *Prospero autumnalis* sont plus riches en c-glycosides que les organes feuilles et bulbes de la population de *Hyacinthoides aristidis*.

D) Teneurs des feuilles et bulbes en composés flavoniques

-Les résultats du tableau 11 montrent que la teneur en aglycones est plus importante que celle des anthocyanes et c-glycosides et la teneur la plus faible est celle des c-glycosides.

-Les teneurs moyennes de chaque classe flavonoïque sont :

- 0.0059±0.0050mg/g pour les aglycones dans les 2 organes.

- 0.0795±0.0459mg/g pour les anthocyanes dans les 2 organes.

- 0.1045±0.0304mg/g pour les c-glycosides dans les 2 organes.

Ces résultats nous amènent à conclure que les teneurs en c-glycosides dans toutes les parties sont proche par contre les teneurs en aglycones et en anthocyanes varient d'un organe à un autre.

Tableau11 : variations des teneurs en composés flavonoïques (aglycones, anthocyanes et c-glycosides) dans les deux parties de la plante (feuille, bulbe) de deux populations *Prospero autumnalis* et *Hyacinthoides aristidis*.

Teneurs Organes	Teneur en Aglycones (mg/g)	Teneur en Anthocyanes (mg/g)	Teneur en c-glycosides (mg/g)
Feuilles	0.0095	0.112	0.126
Bulbes	0.0024	0.047	0.083
Moyenne	0.0059	0.0795	0.1045
L'écart type	0.0050	0.0459	0.0304

L'étude quantitative des différentes classes flavonoïques au sein des deux organes (feuille et bulbe) des deux populations (*Prospero autumnalis* et *Hyacinthoides aristidis*) nous a permis d'estimer que les feuilles des deux espèces de Hyacinthacées ont une teneur relativement élevée en flavonoïdes ; la concentration de ces constituants bioactifs dépend de l'organe considéré. La concentration plus importante dans les feuilles peut être expliquée par leur exposition aérienne qui laisse supposer une agression par les UV. Les flavonoïdes en raison de leur faible potentiel redox, réduisent les radicaux hydroxyles par transfert d'hydrogène. Les radicaux libres seraient responsables d'altérations des acides nucléiques et des processus d'altération ainsi leur propriété de piègeurs de radicaux libres implique les flavonoïdes dans la prévention des dommages oxydatifs causés par les ROS sur les molécules cellulaires. La feuille est en fait le siège de biosynthèse des polyphénols (flavonoïdes) dans le chloroplaste. William et Hopkins(2003) ont rapporté que deux flavonols (Kampférol et quercétine) sont impliqués dans la croissance de la plante régulée par la lumière. La présence de flavonoïdes dans les bulbes bien que leurs teneurs soient faibles pourraient s'expliquer par leur implication dans l'établissement de la symbiose endomycorhizienne caractérisant les plantes à bulbes. La nécessité des flavonoïdes inducteurs a été démontrée en 1986. Les mécanismes d'interaction entre les composés phénoliques inducteurs et la protéine NOD produit par différentes espèces de Glomeromycètes est mal connu.

IV Essai de détermination des caryotypes des deux espèces

Le dénombrement chromosomique effectué sur plusieurs plaques métaphasiques à été réalisé à partir de mitose somatique des deux populations du *Prospero autumnalis* et *Hyacinthoides aristidis*.

Plusieurs essais ont été faits afin d'obtenir des plaques métaphasiques nettes pour le dénombrement des chromosomes des deux populations. Les 2 figures citées ci-dessous montrent que les plaques observées sous microscope photonique G : 40×10 ne permettent pas de compter le nombre des chromosomes à cause probablement de la mauvaise conservation du matériel biologique relatif aux racines des deux espèces de *Hyacinthaceae*.

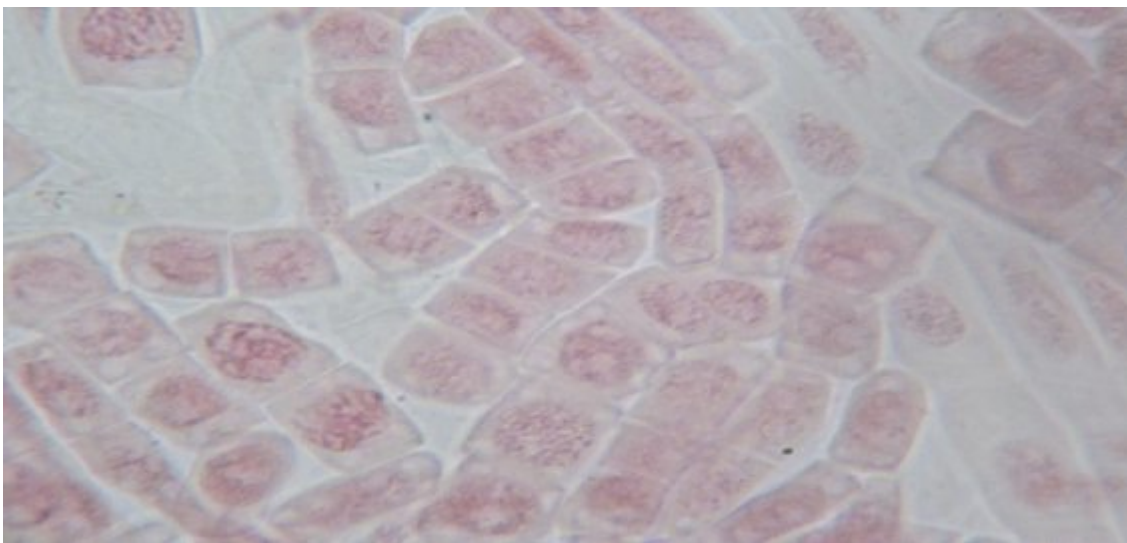


Figure 23: Différentes phases mitotiques de *Prospero autumnalis* observées au microscope photonique G : 40×10 (Laboratoire de CIV, 2016).

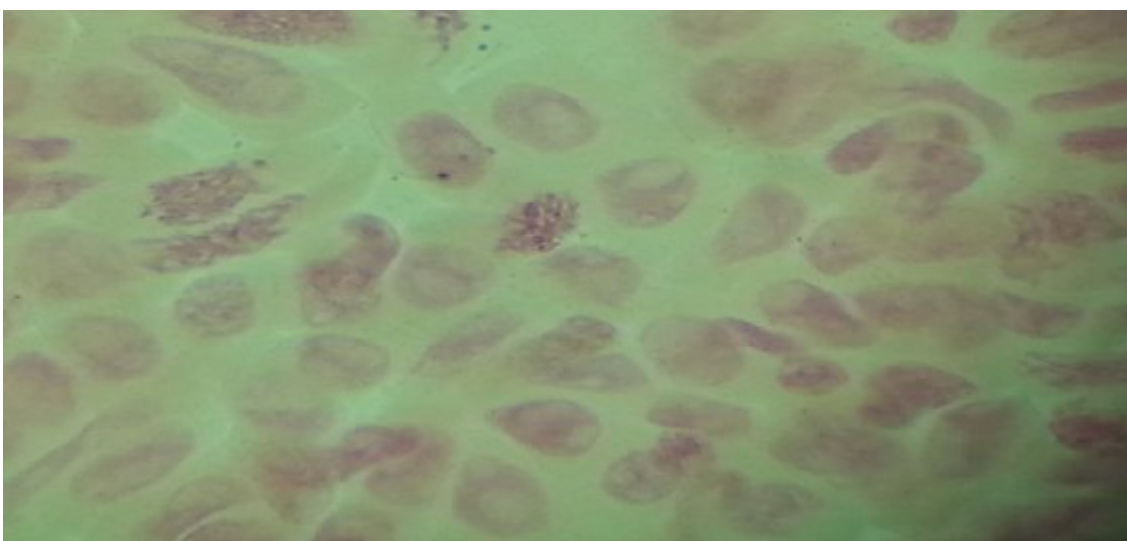


Figure24 : Différentes phases mitotiques de *Hyacinthoides aristidis* observées au microscope photonique G : 40×10 (Laboratoire de CIV, 2016).

D'après les figures 23 et 24 le nombre des chromosomes dénombré est approximativement égale à ($2n=14$) pour *Prospero autumnalis* et ($2n=16$) pour *Hyacinthoides aristidis*.

Selon HAMOUCHE (2014), les trois nombres chromosomiques rencontrés en Algérie ($2n = 14$, $2n = 28$ et $2n = 42$) correspondent aux trois niveaux de ploïdie $2x$, $4x$ et $6x$, reconnus dans le complexe polyploïde de *Prospero autumnalis*.

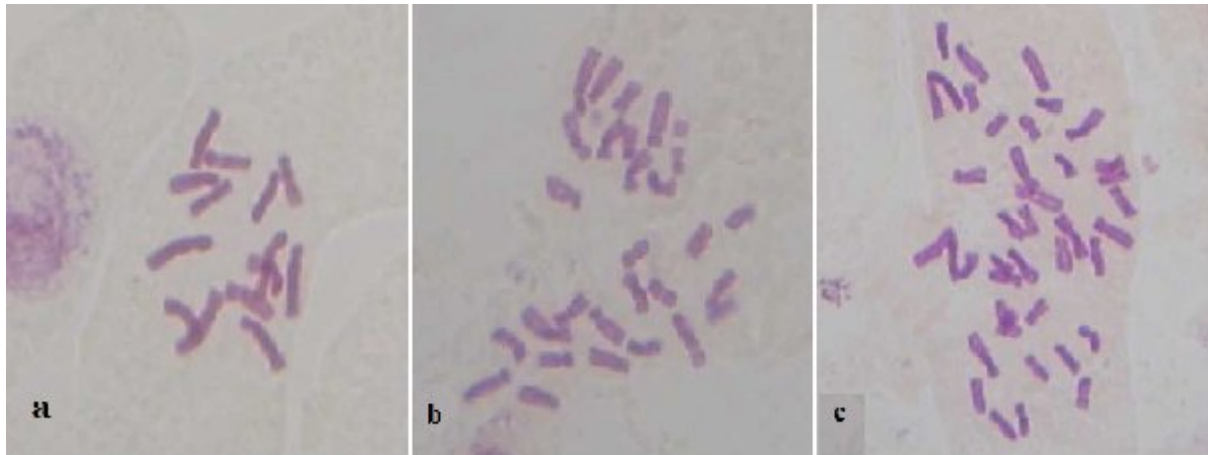


Figure25 : Caryotype de *Prospero autumnalis* d'après HAMOUCHE (2014).

a : $2n = 2x = 14$

b : $2n = 4x = 28$

c : $2n = 6x = 42$

A l'issue de ce travail, l'étude morphométrique a montré qu'il y a une différence significative entre les différents organes (feuilles, fleurs et bulbes) des deux espèces de Hyacinthacées (*Prospero autumnalis* et *Hyacinthoides aristidis*).

Dans l'étude des flavonoïdes, l'hydrolyse acide effectuée, nous a permis d'identifier l'existence des composés flavonoïques dans les feuilles et les bulbes.

Les dosages effectués sur les phases étherées et acides extraites des feuilles et des bulbes des deux espèces ont mis en évidence, la présence de 3 classes de flavonoïdes (Aglycones, Anthocyanes et C-glycosides).

Les feuilles ont révélé une teneur plus importante en flavonoïdes que les bulbes.

L'étude des caryotypes par la méthode de Jahier *et al.*, (1992) a montré que le nombre de chromosomes dénombré est approximativement égale à ($2n=14$) pour *Prospero autumnalis* et ($2n=16$) pour *Hyacinthoides aristidis*.

En perspectives d'étude, il faut savoir qu'il reste encore beaucoup de plantes locales utiles qui n'ont pas été étudiées et qui n'ont pas été analysées afin de déterminer leurs potentialités, dans différents domaines et qui mériteraient d'être investiguées.

Refaire et approfondir l'étude cytogénétique en vue d'élaborer un caryotypique. Il serait également utile d'approfondir les études concernant l'identification des principes actifs du point de vue qualitatif et quantitatif.

Déterminer les chémotypes exacts et complet par CCM, CP, CPG et HPLC. Envisageant des expériences "in situ" en testant ces principes sur des cas pathologiques.

Il serait également intéressant d'extraire les autres principes actifs de la plante tels que les saponosides, tanin et alcaloïdes et de tester leur pouvoir antimicrobien et bactéricide sur un large panel de souches bactériennes et fongiques devenues, à l'heure actuelle, multi résistantes aux antibiotiques.

Annexe 1 : Matrice des mesures morphométriques des feuilles et bulbes de *Prospero autumnalis* et *Hyacinthoides aristidis*

Tableau1 : Population 1 (*Prospero autumnalis*).

Caractères	A	B	C	D	E	F	G	H
1	7.2	0.1	3	1.4	23.7	8.5	1.4	12
2	4.2	0.2	3	1.6	15.5	3.5	1.2	7
3	5.5	0.3	2	1.7	19.2	2.7	0.8	6
4	5	0.1	2	1.1	15.1	2.1	1	4
5	3.5	0.2	2	1.5	21.4	7.7	1.8	11
6	6.3	0.2	3	1.4	14.4	5.2	0.8	10
7	3.1	0.1	3	1.7	19.3	5.8	1	10
8	5.5	0.1	2	1.2	14.3	4.2	1	8
9	2.2	0.1	3	1	15.6	4	1	3
10	7.6	0.1	2	1.3	19.3	4.4	0.8	6

Tableau2 : Population 2 (*Hyacinthoides aristidis*).

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	6	0.8	4	0.7	10.3	2.9	0.5	19
2	6.3	0.8	3	1	8.8	1.2	0.4	6
3	6.8	0.9	3	0.7	10.7	2	0.7	9
4	6	0.7	4	0.8	6	0.2	0.2	4
5	6	0.8	3	1	8.3	1.4	0.4	7
6	5.8	1	4	1	6.5	0.2	0.2	6
7	4.7	0.7	4	1.1	5.2	0.8	0.4	6
8	5.4	0.6	3	0.4	10	1.2	0.4	8
9	7.4	0.8	4	0.7	9	1.2	0.3	10
10	10	1.4	4	1.8	9	1.2	0.5	9

Annexe 2 : Extraction des polyphénols par hydrolyse acide.

Dilution de HCl 10N en HCl 2N

HCl à 37 % (flacon initial)

$$\left. \begin{array}{l} 37\text{g} \longrightarrow 100 \text{ ml} \\ X \text{ g} \longrightarrow 1000 \text{ ml} \end{array} \right\} X = 370 \text{ g}$$

$$\left. \begin{array}{l} 1 \text{ mol d'HCl} = 36.5 \text{ g} \\ X \text{ mol} \longrightarrow 370 \text{ g} \end{array} \right\} X = 10.13 \text{ mol}$$

(HCl 10 N = 370g HCl + 1000 ml d'eau distillée = la solution mère d'HCl 37 %)

$$\left. \begin{array}{l} 10 \text{ N} : 10.13 \text{ mol} \longrightarrow 1000 \text{ ml} \\ 2 \text{ N} : 2 \text{ mol} \longrightarrow X \text{ ml} \end{array} \right\} X = 197.4 \text{ ml}$$

(197.4 ml d'HCl 10 N ajusté jusqu'à 1000 ml d'eau distillée)



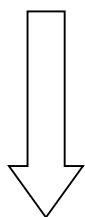
Séparation à l'éther
diéthylique



Hypophase rouge Anthocyanes
et C-glycosides



Séparation au n-butanol



Extrait éthanolique de la phase étherée.



C-glycosides

Quelques étapes du protocole expérimental d'extraction des flavonoïdes

Annexe4 : solutions utilisées pour l'étude cytogénétique des deux espèces de Hyacinthaceae

Préparation de la solution d'acide de 100ml d'acide acétique à 90%

- ❖ 90 ml d'acide acétique + 10 ml d'eau distillé

Préparation de la solution de 100ml d'éthanol à 70%

- ❖ 70ml d'éthanol + 30 ml d'eau distillé

Préparation de la solution de α -Bromonaftalène

- ❖ 5 à 6 gouttes de α -bromonaftalène dans un pilulier d'eau de robinet, agité très bien jusqu'à se que la solution deviens opaque

préparation de la solution d'HCl 1N :

10ml d'HCl 10N+90ml d'eau distillée

Annexe3 : Dosages quantitatifs des flavonoïdes.**1- Les feuilles****1-1 : Population 1 *Prospero autumnalis*****Tableau3 : Dosage quantitatif des Anthocyanes (540nm) HCL2N**

Echantillon	Individu1	Individu2	Individu3
Volume (ml)	8.5	8.5	8.5
Poids(g)	0.115	0.115	0.115
Dilution(d)	d=1	d=1	d=1
Densité optique(DO)	0.035	0.035	0.035
T%(mg/g)	0.134	0.134	0.134

Tableau4 : Dosage quantitatif des c-glycosides (340nm) n.butanol

Echantillon	Individu1	Individu2	Individu3
Volume (ml)	7	7	7
Poids(g)	0.115	0.115	0.115
Dilution(d)	d=1	d=1	d=1
Densité optique(DO)	0.117	0.117	0.117
T%(mg/g)	0.168	0.168	0.168

Tableau5 : Dosage quantitatifdes Aglycones (420nm) Ethanol pur et AL CL₃

Echantillon	Individu1	Individu2	Individu3
Volume (ml)	8	8	8
Poids(g)	0.115	0.115	0.115
Dilution(d)	d=1	d=1	d=1
Densité optique(DO) (éthanol)	0.083	0.041	0.044
Densité optique(DO) (ALCL3)	0.025	0.025	0.025
Δ DO	0.008	0.008	0.008
T%(mg/g)	0.015	0.015	0.015

1-2 :Population2*Hyacinthoides aristidis***Tableau6** : Dosage quantitatif des Anthocyanes (540nm) HCL2N

Echantillon	Individu1	Individu2	Individu3
Volume (ml)	30	30	30
Poids(g)	0.415	0.415	0.415
Dilution(d)	d=1	d=1	d=1
Densité optique(DO)	0.024	0.024	0.024
T%(mg/g)	0.090	0.090	0.090

Tableau7 : Dosage quantitatif des c-glycosides (340nm) n.butanol

Echantillon	Individu1	Individu2	Individu3
Volume (ml)	26	26	26
Poids(g)	0.415	0.415	0.415
Dilution(d)	d=1	d=1	d=1
Densité optique(DO)	0.057	0.057	0.057
T%(mg/g)	0.084	0.084	0.084

Tableau8 : Dosage quantitatif des Aglycones (420nm) Ethanol pur et AL CL₃

Echantillon	Individu1	Individu2	Individu3
Volume (ml)	9	9	9
Poids(g)	0.415	0.415	0.415
Dilution(d)	d=1	d=1	d=1
Densité optique(DO) (éthanol)	0.022	0.022	0.022
Densité optique(DO) (ALCL ₃)	0.007	0.007	0.007
Δ DO	0.015	0.015	0.015
T%(mg/g)	0.004	0.004	0.004

2 : Les bulbes

2-1 : Population 1 *Prospero autumnalis*

Tableau9 : Dosage quantitatif des Anthocyanes (540nm) HCL2N

Echantillon	Individu1	Individu2	Individu3
Volume (ml)	37	37	37
Poids(g)	0.5	0.5	0.5
Dilution(d)	d=1	d=1	d=1
Densité optique(DO)	0.371	0.371	0.371
T%(mg/g)	0.0427	0.0427	0.0427

Tableau10 : Dosage quantitatif des C-glycosides (340nm) n.butanol

Echantillon	Individu1	Individu2	Individu3
Volume (ml)	42	42	42
Poids(g)	0.5	0.5	0.5
Dilution(d)	d=1	d=1	d=1
Densité optique(DO)	0.067	0.067	0.067
T%(mg/g)	0.133	0.133	0.133

Tableau11 : Dosage quantitatif des Aglycones (420nm) Ethanol pur et AL CL₃

Echantillon	Individu1	Individu2	Individu3
Volume (ml)	4	4	4
Poids(g)	0.5	0.5	0.5
Dilution(d)	d=1	d=1	d=1
Densité optique(DO) (éthanol)	0.024	0.024	0.024
Densité optique(DO) (ALCL3)	0.017	0.017	0.017
ΔDO	0.007	0.007	0.007
T%(mg/g)	0.0007	0.0007	0.0007

2-2/ Population 2 *Hyacinthoides aristidis***Tableau12** : Dosage quantitatif des Anthocyanes (540nm) HCL2N

Echantillon	Individu1	Individu2	Individu3
Volume (ml)	34	34	34
Poids(g)	0.5	0.5	0.5
Dilution(d)	d=1	d=1	d=1
Densité optique(DO)	0.015	0.015	0.015
T%(mg/g)	0.053	0.053	0.053

Tableau13 : Dosage quantitatif des C-glycosides (340nm) n.butanol

Echantillon	Individu1	Individu2	Individu3
Volume (ml)	40	40	40
Poids(g)	0.5	0.5	0.5
Dilution(d)	d=1	d=1	d=1
Densité optique(DO)	0.018	0.018	0.018
T%(mg/g)	0.034	0.034	0.034

Tableau14 : Dosage quantitatif des Aglycones (420nm) Ethanol pur et AL CL₃

Echantillon	Individu1	Individu2	Individu3
Volume (ml)	3.5	3.5	3.5
Poids(g)	0.5	0.5	0.5
Dilution(d)	d=1	d=1	d=1
Densité optique(DO) (éthanol)	0.051	0.051	0.051
Densité optique(DO) (ALCL ₃)	0.008	0.008	0.008
Δ DO	0.043	0.043	0.043
T%(mg/g)	0.004	0.004	0.004