

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

UNIVERSITE MOULOUD 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

Extraction de quatre classes de flavonoïdes à partir de trois espèces du genre *Allium* de Kabylie. Évaluation de leurs activités antioxydante et antimicrobienne.

Présenté par : Mr. AMRANE Hocine

Devant le jury

Présidente : Mlle. BOUTEBTOUB W. MCA UMMTO.

Promotrice : Mme TALEB-TOUDERT K. MCB UMMTO

Examinatrice : Mlle. ALI AHMED S. MA CCA UMMTO 2015/2016

Examineur : Mr. MEDJBEUR Dj. MA CCA UMMTO 2015/2016

Soutenu le : 04/07/2016

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

UNIVERSITE MOULOUD MAMMARI 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

Extraction de quatre classes de flavonoïdes à partir de trois espèces du genre *Allium* de Kabylie. Évaluation de leurs activités antioxydante et antimicrobienne.

Présenté par : Mr. AMRANE Hocine

Devant le jury:

Présidente : Mlle. BOUTEBTOUB W. MCA UMMTO.

Promotrice : Mme TALEB-TOUDERT K. MCB UMMTO

Examinatrice : Mlle. ALI AHMED S. MA CCA UMMTO

Examineur : Mr. MEDJBEUR Dj. MA CCA UMMTO

Soutenu le : 04/07/2016

Je remercie Mme TALEB-TOUDERT K. d'avoir dirigé ce travail et pour son aide tous le long de ce travail et son soutien tout le long de mon cursus.

Je remercie les examinateurs d'avoir accepté de faire partie de ce jury d'examinations : Melle BOUTEBTOUB W. de nous avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Melle ALI AHMED S. et Mr. MEDJBEUR Dj. d'avoir accepté de juger ce travail et d'enrichir de leurs connaissances ce modeste travail.

Merci à Mr HOUALI de nous avoir facilité l'accès à son laboratoire de micro biologie au niveau l'UMMTO.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent à Melle Ali Ahmed S. qui a assuré le traitement statistique de mes données malgré ses nombreuses occupations.

Mr. DEGUICHE K. Responsable des moyens généraux du département de Biologie de l'UMMTO pour sa gentillesse et de nous avoir assuré les produits chimiques nécessaires à la réalisation de la partie expérimentale.

Merci Mme. SMAIL S. pour votre aide à accéder au laboratoire d'analyses médicales de l'hôpital de Draa El Mizane.

Merci au camarade Mlle. AZIBI T., Mlle. KHELLIL H., Mr. MAMMAR et Mr. DJAOUI M. pour leur aide pendant la réalisation de la partie expérimentale et leur soutien moral.

Enfin je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidé directement ou indirectement à réaliser mon projet de fin d'études.



Listes de figures

Listes des figures

Figure 01 : les grandes lignes de la biosynthèse des principales composées phénoliques	04
Figure 02 : L'étape clé de la formation des flavonoïdes	07
Figure 03: <i>Allium sativum</i>	10
Figure 04 : <i>Allium roseum</i>	14
Figure 05 : <i>Allium ampeloprasum</i>	18
Figure 06 : localisation des stations d'échantillonnage.	21
Figure 07: <i>Allium sativum</i>	21
Figure 08: <i>Allium ampeloprasum</i>	22
Figure 09 : <i>Allium roseum</i>	22
Figure 10 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH	27
Figure 11 : Zone d'inhibition des C-glycosylflavones d' <i>A. sativum</i> en présence <i>S. aureus</i> .	31
Figure 12 : Zone d'inhibition des proanthocyanes d' <i>A. ampeloprasum</i> en présence <i>S. aureus</i>	31
Figure 13 : Zone d'inhibition des proanthocyanes d' <i>A. sativum</i> en présence <i>S. aureus</i> .	32
Figure 14 : Zone d'inhibition des aglycones d' <i>A. ampeloprasum</i> en présence <i>S. aureus</i> .	32
Figure 15 : Zone d'inhibition des aglycones d' <i>A. sativum</i> en présence <i>S. aureus</i>	32
Figure 16 : Zone d'inhibition des aglycones d' <i>A. roseum</i> en présence <i>S. aureus</i>	32
Figure 17 : Diamètres moyens des zones d'inhibition induites par les extraits	33
Figure 18 : Pourcentage d'inhibition de radical libre DPPH en fonction des concentrations en aglycones	39
Figure 19 : Pourcentage d'inhibition de radical libre DPPH en fonction des concentrations en proanthocyanes.	39
Figure 20 : Pourcentage d'inhibition de radical libre DPPH en fonction des concentrations en C-glycosylflavones.	40
Figure 21 : Pourcentage d'inhibition de radical libre DPPH en fonction de concentrations chez <i>A. Ampeloprasum</i>	40
Figure 22 : Pourcentage d'inhibition de radical libre DPPH en fonction de concentrations chez <i>A. roseum</i>	41
Figure 23 : Pourcentage d'inhibition de radical libre DPPH en fonction de concentrations chez <i>A. sativum</i>	41



Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau 01 : Principales classes de composés phénoliques	03
Tableau 02 : Classe de flavonoïdes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central	06
Tableau 03 : Données GPS des stations	20
Tableau 04 : Diamètres moyens des zones d'inhibition (mm) obtenues avec les deux souches.	31



Table des matières

Remerciement	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Table des matières	
Introduction	01
Partie 01	
Chapitre 01 : Les Composés phénoliques	
1.1. Les Composés phénoliques	03
1.2. Biosynthèse des composés phénoliques	04
1.3. Classification des phénols	05
1.3.1. Phénols simples	05
1.3.2. Acides hydroxybenzoïques	05
1.3.3. Acides hydrocinnamiques	05
1.3.4. Coumarines	05
1.3.5. Flavonoides	06
1.3.5.1. Anthocyanes	06
1.3.5.2. Biosynthèse des flavonoïdes	07
1.4. Les antioxydants phénoliques	07
1.5. Rôles, intérêts et propriétés des polyphénols	07
chapitre 02 : Monographie des plantes étudiées	
2.1. <i>Allium sativum</i>	09
2.1.1. Historique	09
2.1.2. Caractères morphologiques	09
2.1.3. Taxonomies et systématiques	10
2.1.4. Habitat et répartition géographique	11
2.1.5. Données phytochimiques	11
2.1.6. Données pharmacologiques	11
2.1.7. Culture, conservation et commercialisation	12
2.2. <i>Allium roseum</i>	13
2.2.1. Caractères morphologiques	13
2.2.2. Taxonomies et systématiques	15
2.2.3. Habitat et répartition géographique	16
2.2.4. Utilisations traditionnelle	16

2.2.5. Culture, conservation et commercialisation	16
2.3. <i>Allium ampeloprasum</i>	16
2.3.1. Caractères morphologiques	16
2.3.2. Taxonomies et systématiques	17
2.3.3. Habitat et répartition géographique	17
partie 02	
chapitres 03 : Matériel et méthodes	
1.1. Échantillonnage	20
1.2. Le matériel végétal	23
1.3. La souche bactérienne	23
1.4. Extraction des flavonoïdes	23
1.4.1. Analyses quantitatives	23
1.4.1.1. Dosage des proanthocyanes	24
1.4.1.2. Dosage des C-glycosylflavones	24
1.4.1.3. Dosage des aglycones flavoniques	24
1.4.2. Étude statistique	25
1.5. Activité biologique	25
1.5.1. Étude de l'activité antibactérienne	25
1.5.1.1. Protocole expérimental	25
3.1.1.1. Protocole expérimental	25
3.1.1.1.1. Préparation de l'inoculum	25
3.1.1.1.2. Ensemencement	25
3.1.1.1.3. Application des disques d'antibiogramme	26
3.1.1.1.4. Expression des résultats	26
1.5.1.2. Étude statistique	26
1.6. Activité antioxydante des différents extraits flavoniques	26
Chapitre 04 : Résultats et discussion	
4.1. Extraction par hydrolyse acide des quatre classes phénoliques	28
4.1.1. Cas d' <i>Allium sativum</i>	28
4.1.2. Cas d' <i>Allium ampeloprasum</i>	28
4.1.3. Cas d' <i>Allium roseum</i>	29
4.1.4. Dosage des protoanthocyanes chez les trois espèces du genre <i>Allium</i>	29

4.1.5. Dosage des C-glycosylflavones chez les trois espèces <i>d'Allium</i>	29
4.1.6. Dosage des aglycones flavonols chez les trois espèces <i>d'Allium</i>	29
4.1.7. Dosage des aglycone flavones chez les trois espèces <i>d'Allium</i>	29
4.1.8. Discussion	29
4.2. Activité antibactérienne des différentes classes de flavonoïdes extraits	30
4.2.1. Résultats	30
4.2.2. Discussion	33
4.3. Activité antioxydante	35
4.3.1. Résultats	35
4.3.2. Discussion	38
Conclusion	43
Références bibliographique	
Annexes	



Introduction

Jusqu'à la fin du siècle dernier, les médicaments utilisés pour le traitement des maladies étaient des produits naturels, dérivés ou non de la matière vivante le plus souvent des végétaux. Des parties de plantes séchées mais des fois fraîches renferment des substances exerçant une action thérapeutique mais aussi des composés toxiques. Pour les traitements, en général, l'administration d'un ensemble de molécules de nature très diverse est obligatoire. La concentration d'une molécule donnée dans un produit naturel peut varier de façon importante selon son lieu de recueil, son mode de culture (moment de la récolte) et ses conditions de stockage (LULLMANN et *al.*, 2001).

Les composées phénoliques des végétaux jouent un rôle important, chez l'homme, en agissant directement sur la qualité nutritionnelle des fruits et légumes et leur impact sur la santé des consommateurs, elles constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez les plantes médicinales (MACHEIX et *al.*, 2005).

Les polyphénols sont également utilisés dans l'industrie agro-alimentaire comme additif, colorant, arôme ou agent de conservation (BRUNETON, 1999).

Le genre *Allium* comprend des espèces de bulbeuses géophytes caractérisées par leur grande diversité morphologique et physiologique. Il est probablement le plus grand genre des monocotylédones pétaloïdes. La plupart des espèces produisent des quantités remarquables de cystéine sulfoxydes provoquant l'odeur caractéristique bien connue et le goût. Ce genre est naturellement distribué uniquement dans l'hémisphère Nord, principalement dans les régions qui sont à saison sèche. Il dispose d'un centre principal de la diversité des *Allium* qui est le plus grand au Sud-ouest et de l'Asie centrale, et de la région méditerranéenne, il y a un deuxième plus petit centre de la diversité en Amérique du Nord (FRIESEN, 2002). Parmi les espèces du genre d'*Allium*, nous pouvons citer

Allium sativum très utilisé en Kabylie (nord Algérien) en médecine traditionnelle et ce afin de soigner l'hypertension artérielle. Il renferme de petites concentrations en flavonoïdes avec 0.56 mg/g extrait comme rapporté par GORINSTEIN et *al.* (2009)

Allium roseum est une espèce à très haut polymorphisme représenté par 12 taxons différents en Afrique du nord : 4 variétés, 3 sous variétés et 4 formes utilise. Il est utilisé comme condiment mais aussi pour soigner les maux de tête, les problèmes respiratoires et les rhumatismes (LE FLOC'K, 1983)

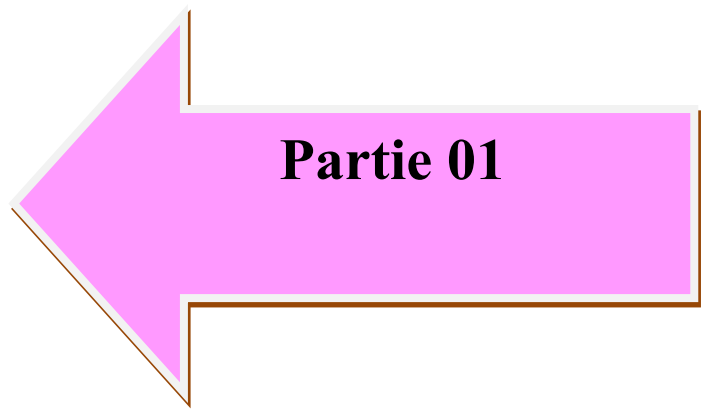
Allium ampeloprasum est un aliment hypoenergetique et une bonne source d'énergie, de fibre, zinc et a révèle une prédominance en acide gras insaturés comme l'acide linoléique.

C'est une espèce stable et adaptée aux environnements perturbés (GARCIA-HERRERA *et al.*, 2014)

Les constituants polyphénolique, les activités biologique et les profils des huiles essentielle représentent une empreinte pour la différenciation des différents chemotypes.


La surproduction de radicaux libres dans l'organisme et le déficit du système immunitaire endogène peuvent engendrer des pathologies graves. Actuellement, de nombreuses études sont orientées vers le renforcement du système endogène par des substances naturelles extraites des plantes caractérisées par leur pouvoir antiradicalaire.

L'objectif de notre travail est d'évaluer la richesse de trois espèces d'*Allium* : *A. sativum*, *A. roseum* et *A. ampeloprasum* en quelques composés phénoliques et à déterminer leurs propriétés biologiques. Pour cela nous avons reparti notre travail en une introduction suivie d'une synthèse bibliographique puis le matériel et les méthodes utilisées dans l'étude phytochimique basée principalement sur l'extraction et la quantification de quatre classes de flavonoïdes (proanthocyanes, C-glycosylflavones, aglycones flavones et aglycones flavonols), par spectrophotométrie. L'évaluation de l'activité antioxydante des proanthocyanes, C-glycosylflavones et aglycones, vis-à-vis du radical libre DPPH et un test antibactérien vis a vis est *Staphylococcus aureus*. C'est alors que nous avons procédé a l'exposition des résultats et à leur discussion et enfin une conclusion et des perspectives d'étude complètent et terminent notre étude.



Partie 01

Chapitre 01



**Les composés
phénoliques**

1.1. Les Composés phénoliques

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux, caractérisés par la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside...etc. (BRUNETON, 1999)

Les composés phénoliques participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés, ils contribuent activement aux interactions de la plante avec son environnement en jouant soit le rôle de signaux de reconnaissance entre les plantes (Allélopathie), ou bien lui permettant de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes, donc ces composés jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel. Aussi, d'un point de vue thérapeutique, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve dans les plantes médicinales Ils peuvent être regroupés en de nombreuses classes 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 modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation et de méthylation, etc.). Enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, etc.) (MACHEIX et *al.*, 2005) (Tableau 01).

Tableau 01 : Principales classes de composés phénoliques (MACHEIX et *al.*, 2005).

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine (exemple)
C ₆	Phénols simples	Catéchol	
C ₆ -C ₁	Acides hydroxybenzoïques	<i>p</i> -Hydroxybenzoïques	Épices, Fraise
C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinnamiques	Acides caféïque, férulique	Pomme de terre, pomme
	Coumarines	Scopoléitine, esculétine	Citrus
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones	Juglone	Noix
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes	Resvératrol	Vigne
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes		
	♣ Flavonols	Kaempférol, quercétine	Fruits, légumes,
	♣ Anthocyanes	Cyanidine,	fleurs
	♣ Flavanols	pélagonidine	Fleurs, fruits rouges
	♣ Flavanones		
	♣ Isoflavonoïdes	Catéchine, épicatechine	Pomme, raisin
		Naringénine	Citrus
Daidzéine		Soja, pois	
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes	Pinorésinol	Pin

(C ₆ -C ₃)n	Lignines	Bois, noyau des fruits
(C ₁₅)n	Tannins	Raisin rouge, kaki

1.2. Biosynthèse des composés phénoliques

L'origine biosynthétique des composés phénoliques des végétaux est proche, tous dérivant de l'acide shikimique. Cette voie shikimate conduit à la formation des oses aux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés : acide benzoïque, acétophénones, lignanes et lignines, coumarines (BRUNETON, 1993). Le processus de biosynthèse des composés phénoliques est résumé dans la fig. 01.

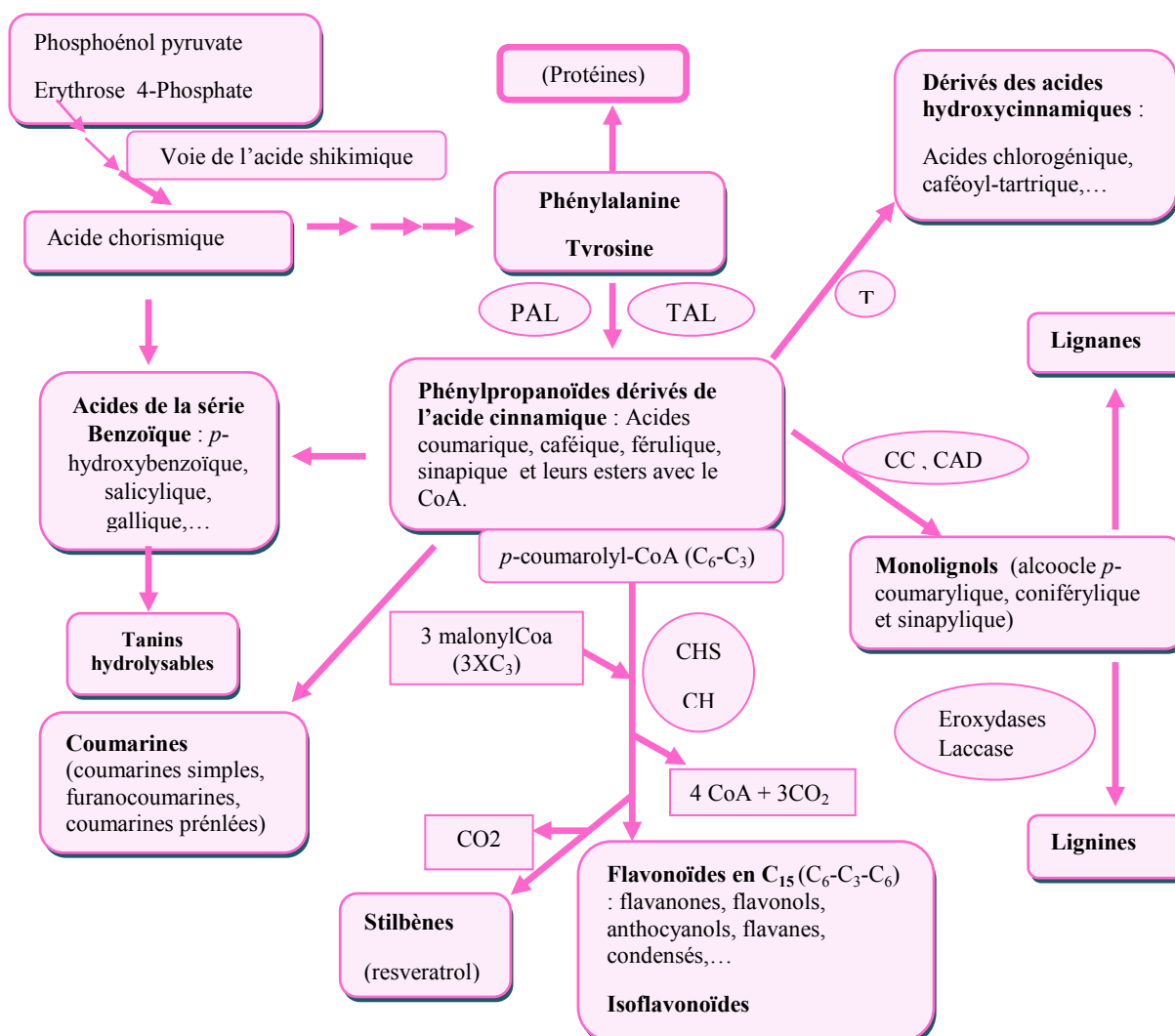


Figure 01 : les grandes lignes de la biosynthèse des principaux composés phénoliques (MACHEIX *et al.*, 2005). Abréviations des principales enzymes: PAL: phénylalanine ammonialyase; TAL: tyrosine ammonialyase; CCR: cinnamate CoA réductase; CAD: Cinnamyl alcool déshydrogénase; CHS: chalcone synthase; CHI: chalcone flavanone isomérase; PPO: polyphénoloxydases; POD: peroxydases; Lacc: laccases.

1.3. Classification des phénols

1.3.1. Phénols simples

Les formes phénoliques les plus simples C_6 ne sont pas présentes naturellement chez les végétaux (MACHEIX et *al.*, 2005).

1.3.2. Acides hydroxybenzoïques

Les acide hydroxybenzoïques, (p-hydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique, gallique, syringique, salicylique, gentisique...) sont dérivé de l'acide benzoïque. Ils ont une formule de base de type C_6-C_1 . Ils sont souvent spécialement bien représentés chez les Gymnospermes et les Angiospermes d'où ils sont souvent libérés après hydrolyse alcaline du matériel végétal. Les acides hydroxybenzoïques existe fréquemment sous forme d'esters ou de glucosides hydrosolubles, à l'exemple de l'acide salicylique dont le glucoside ou les esters méthyliques ou glucosylés représentent vraisemblablement des formes de stockage ou de circulation dans la plante (MACHEIX et *al.*, 2005)

1.3.3. Acides hydrocinnamiques

Ils représentent une classe importante dont la structure de base C_6-C_3 dérivé de celle de l'acide cinnamique. Le degré d'hydroxylation de cycle benzénique et son éventuelle modification par des réactions secondaires (par méthylation chez les acides férulique ou sinapique) sont un des éléments importants de la réactivité chimique de ces molécules. L'existence d'une double liaison dans la chaîne latérale conduit à deux séries isomères (*cis* ou *Z* et *trans* ou *E*) dont les propriétés biologiques peuvent être différentes. Les formes *trans* sont cependant naturellement prépondérantes et il est possible que les formes *cis* ne correspondent qu'à des artefacts d'extraction. Les molécules de base de la série hydroxycinnamiques, souvent rapporte sous le terme commun de *phenylpropanoïdes*, sont l'acide *p*-coumarique (et ses isomères, les acides *a*- et *m*-coumarique), l'acide caféique, l'acide férulique et son dérivé 5-hydroxyle, et enfin l'acide sinapique (MACHEIX et *al.*, 2005).

1.3.4. Coumarines

La structure de base C_6-C_3 , une centaine différentes ont été décrites et identifiées. Elles sont généralement substituées en C_7 par un hydroxyle. Elles existent sous forme libre et hétéroside. Elles sont souvent prénylée en furanocoumarine ou pyranocoumarine (ombelliferone, hernarine, esculetol, scopoletol, fraxetol) (MACHEIX et *al.*, 2005).

1.3.5. Flavonoïdes

L'élément de structure de base est le phenylbenzopyrane constitué de 2-phenylchromane c'est à dire deux noyaux benzéniques (A et B) relié par un hétérocycle pyranique constituant le noyau C. les flavonoïdes sont regroupés en une dizaine de classe selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central (Tableau 02).

Dérivent de l'enchaînement benzo- γ -pyrone, c'est la structure de l'hétérocycle central et son degré d'oxydation qui permet de distinguer les différentes classes de flavonoïdes. Leur structure de base est C₆-C₃-C₆. C'est la classe des composés phénoliques la plus vaste. Il existe plus de 4000 structures différents soit la moitié des polyphénols.

1.3.5.1. Anthocyanes

Le terme anthocyanes à une valeur générale désignant, soit les formes naturelles glycosylées, soit les molécules non glycosylées, entrent dans la composition de nombreux végétaux (surtout les fruits). Il existe sous forme d'esters hydrosolubles (acide caféique), ou insoluble associés aux fibres (acide ferulique). La partie non phénolique correspondant à un acide organique (acide quinine, acide tartrique) ou à un sucre (MACHEIX *et al.*, 2005).

Tableau 02 : Classe de flavonoïdes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central.

Type	Noyau C	Exemple nombre d'OH
Flavone	2-Phénylchromone	Apigénine (5, 7, 4')
Flavanol = Flavan-3-ol	2-Phénylchromane	Catéchine (5, 7, 3', 4')
Flavandiol = Flavan-3,4-diol	2-Phénylchromane	Leu Cocyanidine (5, 7, 3', 4')
Flavanone	2-Phénylchromone	Butine (7, 3', 4')
Dehydroflavonol	2-Phénylchromone	Taxifoline (5, 7, 3', 4')
Flavonol	2-Phénylchromone	Myricétine (5, 7, 3', 4', 5')
Anthocyane	2-Phénylbenzopyrilium	Pelargonidine (5, 7, 4')
Isoflavone	3-Phénylchromone	Génistéine (5, 7, 4')
Chalcone		Buteine (3, 4, 2', 4')
Dehydrochalcone		

Ces flavonoïdes existent sous forme d'hétérosides dont certains ont une très grande importance biologique et technologique: les anthocyanes pigments rouge ou bleu, les flavones et les flavonols de couleur crème ou jaune clair, les flavanes dont les produits de condensation sont à l'origine d'un groupe important de tanins et les isoflavones qui jouent un rôle dans la santé humaine (MACHEIX *et al.*, 2005)

1.3.5.2. Biosynthèse des flavonoïdes

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et, de ce fait, possèdent le même élément structural de base, à savoir l'enchaînement phényl-2 chromane. L'étape clé de la formation des flavonoïdes est la condensation, catalysée par la chalcone synthase, d'une unité phényle propanoïde (4-coumaroyl-CoA) avec trois unités malonyl-CoA, la structure de base en C-15 sous forme d'une chalcone soit 4,2',4',6'-tetrahydroxychalcone (BRUNETON, 1999) (fig. 02).

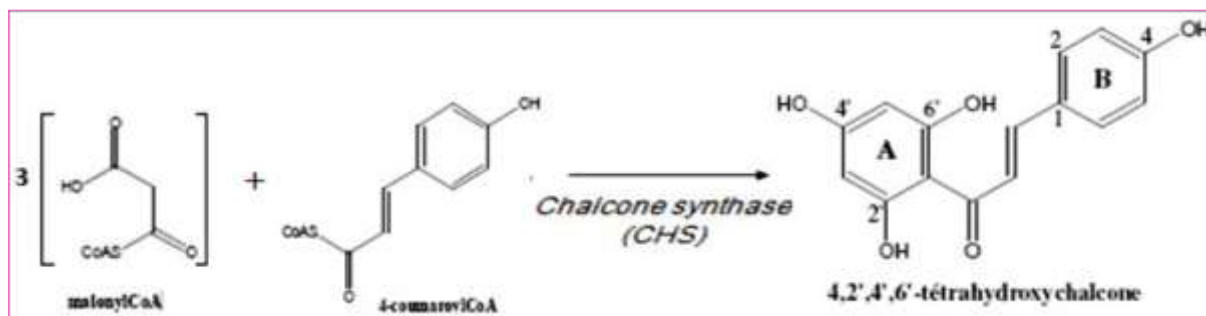


Figure 02 : L'étape clé de la formation des flavonoïdes (BRUNETON, 1999).

1.4. Les antioxydants phénoliques

Parmi les antioxydants naturels, les composés phénoliques, et plus particulièrement les acides phénoliques et les flavonoïdes, suscitent un intérêt grandissant.

Ce sont des composées, naturels, qui permet de ralentir le phénomène d'oxydation qui favorisent le vieillissement cellulaire on interrompant le passage du stress oxydatif et interceptant le message de l'apoptose (MACHEIX et *al.*, 2005).

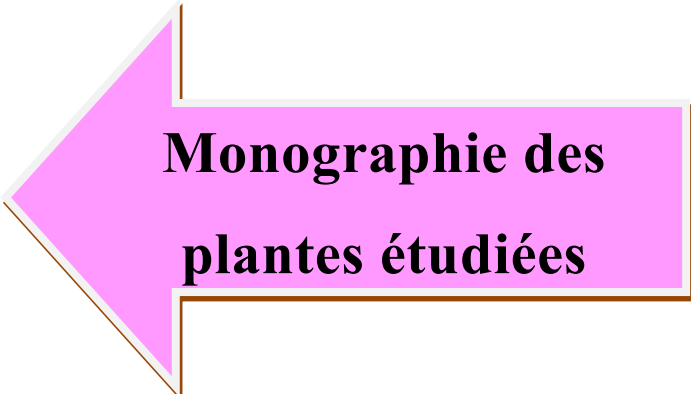
1.5. Rôles, intérêts et propriétés des polyphénols

Selon MACHEIX et *al.* (2005), on peut cite ces quelques principale rôle des compose phénoliques

- ♣ Dans la fertilité, la pigmentation, la signalisation et la protection contre des agents biotiques et abiotiques et encore la formation de polymères structuraux comme la lignine.
- ♣ Dans les réactions aboutissent à la formation au niveau de la blessure d'un tissu cicatriciel résistant aux infections lorsque la plante est soumise à des blessures mécaniques.
- ♣ Dans les critères de qualité (couleur, astringence, amertume et qualité nutritionnelles...) qui orientent les choix de l'homme dans sa consommation des organes végétaux (fruits, légumes, tubercules) et des produits qui en dérivent par transformation.

- ♣ Dans la variation de certaines caractéristiques des végétaux lors des traitements technologiques (préparation des jus de fruits, des boissons fermentées ...) pendant lesquels apparaissent fréquemment des brunissements enzymatiques qui modifient la qualité du produit fini.
- ♣ Dans la participation à la prévention de diverses pathologies, par les propriétés antioxydantes ou anti-inflammatoires, qui impliquent le stress oxydant et le vieillissement cellulaire, les maladies cardiovasculaires ou dégénératives, l'ostéoporose.
- ♣ Servent essentiellement comme pigments puisque la plupart sont colorés dans le visible et ils filtrent les UV.
- ♣ Phytoalexines, antibiotique produit par certains végétaux en cas d'agression bactérienne.

Chapitre 02



**Monographie des
plantes étudiées**

Le genre *Allium* comprend plus de 800 espèces, 15 sous-genres et plus de 70 sections de plantes herbacées, ces vivaces se trouvent naturellement dans l'hémisphère nord. Plusieurs critères ont été utilisés dans la classification taxonomique de ce taxon, certains caractères se sont révélés utiles à des niveaux sous-génériques et sectorielles, y compris la structure et la forme de rhizome et des bulbs. Beaucoup d'autres organes couramment utilisés dans les descriptions d'espèces, comme les caractères anatomiques des feuilles, de l'ovaire, du septum nectaires et des semences. La microscopie électronique à balayage (MEB) a grandement amélioré la taxonomie du genre, facilitant les études de l'ultrasculpture et aide l'ornementation a développé et amélioré les graines et les bulbs. (FRIESEN et *al.*, 2006). Ci-dessous sont décrites les trois espèces sélectionnées pour notre étude :

2.1. *Allium sativum*

2.1.1. Historique

Allium sativum est une plante médicinale par excellence, elle est sans danger pour un usage domestique et se révèle efficace pour traiter une multitude de problèmes de santé (Larousse, 2001). Les Hébreux l'introduisirent en Palestine, les Grecs et les Romains en faisaient grand usage et les croisés l'emmenèrent en France. La partie utilisée est les gousses (bulbes) (*bulbus alii sativi*) (SCHAUENBERG et *al.*, 1977). Fit l'objet d'une monographie à la pharmacopée jusque en 1965, utilisé aussi employé en phytothérapie (BRUNETON, 1993). Nombre de chromosomes $2n = 16$ (FRIESEN et *al.*, 2006).

2.1.1. Caractères morphologiques

L'ail est une plante vivace bulbeuse, produit une hampe florale dressée atteignant 70 cm de hauteur et fleurait juillet-août (SCHAUENBERG et *al.*, 1977).

Après la plantation en novembre à décembre la plante en mois de juin émis 12 feuilles linéaires engainantes, et une inflorescence en ombelles globuleuse de fleurs blanches ou rougeâtre entourées d'une longue spathe caduque terminée en pointe, composée à la fois de fleurs et de bulbilles (sans faire l'ablation manuelle de 2 à 3 fois des bulbilles, les fleurs se dessèche). Le bulbe issu de bourgeon axillaire différencie à la base des grains foliaire de deux dernières feuilles (MESSIAEN et *al.*, 1993), est formé de caïeux (les gousses) insérés sur un plateau aplati, entourée d'une tunique commune blanchâtre, l'odeur faible se développe et devienne forte et soufrée dès que les tissus sont lésés (BRUNETON, 1993) (fig. 3).



Figure 03: *Allium sativum* (Tizi gheniff, 2015)

2.1.2. Taxonomies et systématiques

Classification de Cronquist (1981)

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Liliopsida
Sous-classe	Liliidae

Ordre	Liliales
Famille	Liliaceae
Genre	<i>Allium</i>
Espèce	<i>sativum</i>
Classification APG III (2009)	
Ordre	Asparagales
Famille	Amaryllidaceae
Sous-famille	Allioideae

2.1.3. Habitat et répartition géographique

Originaire de l'orient (Inde ou Asie centrale), l'ail est cultivé dans le monde entier (SCHAUENBERG et *al.*, 1977). Elle ce trouvait déjà en Egypte vers 4500 av. J.-C, l'ail a été introduit en Occident pendant la conquête romaine (LAROUSSE, 2001).

2.1.4. Utilisation traditionnelle

Les vertus culinaires de l'ail sont universellement reconnues, en médecine traditionnelle, l'ail est utilisé sous différents formes (huile (Ol.Aliisativi), extrait, macération, dragées, etc.). Une teinture de gousses fraîche est préparée en homéopathie, c'est un remède polyvalent très prise en médecine populaire. (SCHAUENBERG et *al.*, 1977). Les phytomédicaments à base du bulbe sont indique seulement, dans le traitement des troubles circulatoires mineurs Largement utilisé comme condiment, en France, (BRUNETON, 1993).

Avant l'invention des antibiotiques 1 ail utilisait pour soignait toutes sortes de maladies, de la tuberculose à la typhoïde, mais également pour panser les blessures durant la première guerre mondiale (LAROUSSE, 2001).

2.1.5. Données phytochimiques

Toute la plante contient une huile essentielle à action antibiotique composée d'allcine, de sulfides, de diallyle, d'une enzyme l'alliase, de divers ferment, de vitamine A1, B1, B2 et de nicotylamide (SCHAUENBERG et *al.*, 1977). La drogue renferme des sucres (fructanes), mais surtout connue pour ses composée soufrés. Les constituant principale de l'ail frais non contusé est alliine ou S-allyl-L(+)-cystéine sulfoxyde, lorsque les tissus sont coupés ou broyés, l'alliine est dégradé par une enzyme, l'aliinase (=S-alkyl-L-cystéine sulfoxyde lyase), en acide pyruvique et acide 2-propènesulfénique, ce dernier étant aussitôt transformé en

alliicine (0,3% de la masse fraîche). L'oxydation à l'air de l'alliicine conduit au 1,7-dithiaocta-4,5-diène, connu sous le nom de disulfure de diallyle, c'est le constituant majoritaire de l'essence d'ail. L'analyse fine des extraits alcooliques d'ail montre également la présence de produits de condensation de l'alliicine les 6Z et 6E-ajoènes (4, 5,9-trithiadodéca-1, 6,11-triène-9-S-oxyde) et de produits de cycloaddition du propènethial (vinyldithiines). D'après le travail publié par block *et al.*, en 1992 montre que beaucoup de compose identique en CPG dans les diverses essence d'ail ne sont que des artefacts ; l'analyse en CLHP des produit obtenus par simple distillation sous vide poussée et à température ambiante en met en évidence que des thiosulfates R-S(O)S-R' ; l'alliicine (R=R'= allyl), étant nettement prépondérante (80-90 %) (BRUNETON, 1993).

2.1.6. Données pharmacologiques

Les propriétés de l'essence de l'ail exercent une action irritant sur la peau et les muqueuses gastriques, il est stomachique, vermifuge, antispasmodique, carminatif, antiseptique intestinal, prophylactique très actif contre la dysenterie amibienne, la typhoïde et d'autres maladies infectieuses, il est aussi, cholérétique et cholagogue, diurétique et expectorant, fébrifuge et agit favorablement contre l'hypertension, prévenant ainsi l'artériosclérose. C'est un biocatalyseur efficace. L'allyle passe dans le système circulatoire, avant d'être éliminé par les poumons et par l'épiderme (SCHAUENBERG *et al.*, 1977).

Plusieurs de ces propriétés attribuées traditionnellement à l'ail ont été vérifiées dans des laboratoires, c'est le cas des activités antibactérienne et antifongique mises en évidence in vitro. Au cours des dernières années, l'expérimentation chez l'animale a montré que des extraits d'ail (dont la nature n'est pas toujours bien précisée) sont susceptible de diminuer cholestérolémie et triglycéridémie (lapin, rat) et d'exercer des effets antihypertenseurs (rat). Les propriétés anti-agrégantes plaquettaires démontrées in vitro, sont liées aux ajoènes, inhibiteurs de la lipoxigénase. Même si les essais cliniques ne sont pas rares, ils sont trop souvent conduits avec des préparations plus ou moins définies et des protocoles critiquables, ce qui peut expliquer l'inconstance des résultats observés, et suivant des protocoles critiquables. Un essai multicentrique en double aveugle récent tend cependant à montrer l'intérêt de la poudre d'ail standardisée en alliine (1,3 %) comme hypocholestérolémiant (800 mg/jour pendant 4 mois). D'autres essais, à confirmer eux aussi, sont indicatifs d'une activité fibrinolytique. Par ailleurs, des données épidémiologiques partielles montrent que la consommation régulière d'ail est inversement corrélée au risque de cancer gastrique (BRUNETON, 1993).

2.1.7. Culture, conservation et commercialisation

D'après ITCMI (2010), les principales variétés cultivées en Algérie sont : Rouge local, Rose de Kabylie et Violet de Kadours.

L'ail à un cycle végétatif de 120 jours, c'est une plante des jours longs et préfère les climats relativement doux (20 à 22 °C). Il est cultivé dans des sols argileux-calcaires, limoneux ou sableux, bien drainés sans excès d'azote, avec un pH de 6 à 7,5 et une salinité de 1,90 à 3,2 g / l (3 à 5 mmhos/ cm-1). Le semé se fait en octobre- novembre dans les zones littorales et en fin décembre début janvier dans les zones intérieures. Pour un hectare on sème entre 8 à 10 qx de caïeux (150 000 à 200 000 plants/ ha) environ 50 caïeux par m², en tenant compte de la distance, 0,30 m entre les rangs et 0,15 à 0,18 m entre plants, pour un rendement de 35 à 80 qx / ha selon les variétés et les conditions de culture. La récolte s'effectue après jaunissement des feuilles et l'amollissement des fausses tiges, le dessèchement des bulbes dure 4 à 5 jours, ces dernières sont conservées dans des locaux secs, bien aérés et froids avec des températures optimum de 12 à 15°C (ITCMI, 2010).

2.2. *Allium roseum*

2.2.1. Caractères morphologiques

Allium roseum est une vivace bulbeuse ovoïde, atteignant plus 40 cm de hauteur ; ses feuilles linéaires glauques sont canaliculées longues et étroites ; l'inflorescence est ombelle plus ou moins dense, issue d'une spathe à 3 ou 4 divisions, avec des fleurs roses ou parfois blanches pédicellée ; a périanthe campanule de 6 divisions larges ovales-oblongues, souvent extérieurement veines de pourpre ; 6 étamines a anthères jaunes et petites, filets larges et aplatis ; autour de l'ovaire verdâtre un style blanc. Fruits capsulaires (BATTANDIER et *al.* 1895 ; BENISTON et *al.*, 1984). la tige est lisse, dressée long de 15 à 60 cm, cylindrique atteignant 6 mm de diamètre à la base, généralement glabre parfois un peu puberulente a la base, ou elle est seulement feuillée (MAIRE, 1958), bulbe à tuniques externes ponctuées alvéolées (QUEZEL et SANTA., 1962). (fig. 04)



Figure 04 : *Allium roseum* (Trimitine, 2015)

2.2.2. Taxonomies et systématiques

Classification de Cronquist (1981)

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Liliopsida
Sous-classe	Liliidae
Ordre	Liliales
Famille	Liliaceae
Genre	<i>Allium</i>
Espèce	<i>roseum</i>

Classification APG III (2009)

Ordre	Asparagales
Famille	Amaryllidaceae
Sous-famille	Allioideae

D'après le Centre de Coopération Méditerranéen, l'IUCN (2005), *A. roseum* L. est une espèce très polymorphe, elle se présente en l'Afrique du nord, sous douze taxons distincts, quatre variétés, quatre sous-variétés et quatre formes, par lequel on peut mentionner :

- ♣ la var. *grandiflorum* Briq., qui comprend deux subdivisions, la sub. Var. *typicum* Regel. caractérisé par des inflorescences qui n'ont pas de bulbilles, avec des fleurs bien développées, et la sub. Var. *bulbiferum* Kerl.-Gawl., où les fleurs sont remplacées par bulbilles sessiles
- ♣ la var. *perrotii* Maire, avec une seule subdivision, la sub. Var. *bulbillosum* Maire, où l'ombelle porte des fleurs et des bulbilles
- ♣ la var. *odoratissimum* est diploïde ($2n = 16$), elle se différencie des autres taxons, par des feuilles charnues semi-cylindriques étroites et des fleurs blanches ou rosées très parfumées.

2.2.3. Habitat et répartition géographique

Elle se trouve dans les régions méditerranéens dans les broussailles, cultures, commun dans le tell et sur les hauts plateaux (BENISTON et *al.*, 1984). L'Afrique du nord endémique, de la Cyrénaïque au Maroc (IUCN, 2005).

2.2.4. Utilisations traditionnelle

A. roseum est utilisé en cataplasmes contre les piqûres d'insecte et de scorpions, les morsures de serpents, pathologie de la peau, antidotes émétiques et antivenimeux (BELLAKHDAR, 1997). Encore utilisé pour soigner le rhume, utilisé traditionnellement comme condiment, remplace parfois l'oignon. En Tunisie par exemple, on ferait un Loussa avec les feuilles fraîches pilées, un peu de sel et de l'huile d'olive qui peut être consommé immédiatement ou maintenu pendant environ un mois. Les feuilles écrasées sont également mélangés avec du blé ou de l'orge farine pour faire une sorte d'omelette ou crêpe (IUCN, 2005).

2.2.5. Culture, conservation et commercialisation

Le cycle végétatif d'*A. roseum* commence avec les premières pluies d'automne, à la fin de l'hiver elle atteint la pleine floraison. La pollinisation est allogame. Aujourd'hui, l'ail rosé est commercialisé au sud de la Tunisie à très bas prix, même si, l'espèce ni pas encore cultivée, elle doit être protégée, car elle est recueillie d'une façon très destructive. L'intérêt économique croissant de cette plante var. *odoratissimum*, et le risque d'érosion génétique qui pèse sur elle, aujourd'hui, la protection et la domestication de cette espèce sont devenus une nécessité urgente. L'Institut des Médenine des Régions Arides a récemment développé un programme de recherche pour protéger, conserver, améliorer et domestiquer ce taxon (IUCN, 2005).

2.3. *Allium ampeloprasum*

2.3.1. Caractères morphologiques

Allium ampeloprasum est une herbe glabre \pm glaucescente ; bulbe ové ou ové-subglobuleux, à tuniques membraneuses blanchâtres, ordinairement accompagné de bulbilles petites, jaunes, brunes ou rougeâtres, sessiles ou brièvement pédonculées, parfois subdivisé en caïeux analogues à ceux d'*A. Sativum*, mais moins nombreux, parfois simple sans caïeux ni bulbilles ; tige cylindrique, pouvant atteindre 1,95 m long et 2,2 cm diamètre ; feuillée jusqu'au 1/4-1/3. Glauque ou juste un peu ; feuilles largement linéaires ou linéaires-lancéolées, pouvant atteindre 60 x 3 cm, fortement carénées, ordinairement \pm scabres sur les

marges et la carène, longuement atténuées et aiguës au sommet, vertes \pm glaucescentes, ligulées ; spathe unique, membraneuse, blanchâtre, longuement acuminée-rostrée, dépassant ou presque l'inflorescence, caduque ; inflorescence multiflore, ordinairement subsphérique, parfois \pm hémisphérique, pouvant atteindre 11 cm diamètre ; pédoncules inégaux, la plupart beaucoup fleur, les internes pouvant atteindre 7 cm, habituellement pourvus à la base d'une petite bractée scarieuse ; périanthe campanule, 4 à 6 mm longueur, purpurin \pm foncé, blanchâtre ou verdâtre; tépales subégaux, carénés, à carène scabre, parfois scabres sur tout le dos, oblongs-lancéolés, obtusiuscules ou aigus. Etamines généralement plus grande que le périanthe (le plus souvent le dépassant de la moitié de leur longueur), filets externes lancéolés, progressivement atténués au sommet, filets internes à cuspide médiane égalant couramment la moitié des cuspidés latérales et de la partie indivise du filet; anthères jaunes ou violacées, c. 0,8 mm ; style \pm longuement exsert. Capsule ovée trigone; graines noires, très finement ponctuées-papilleuses (par la saillie du milieu des cellules épidermiques), c. 3 mm longueur, formes anguleuses. Période de floraison: avril-juillet. Cette espèce est très polymorphe (MAIRE, 1958). nombre de chromosomes $2n = 32$ (FRIESEN et *al.*, 2006) (fig.5).

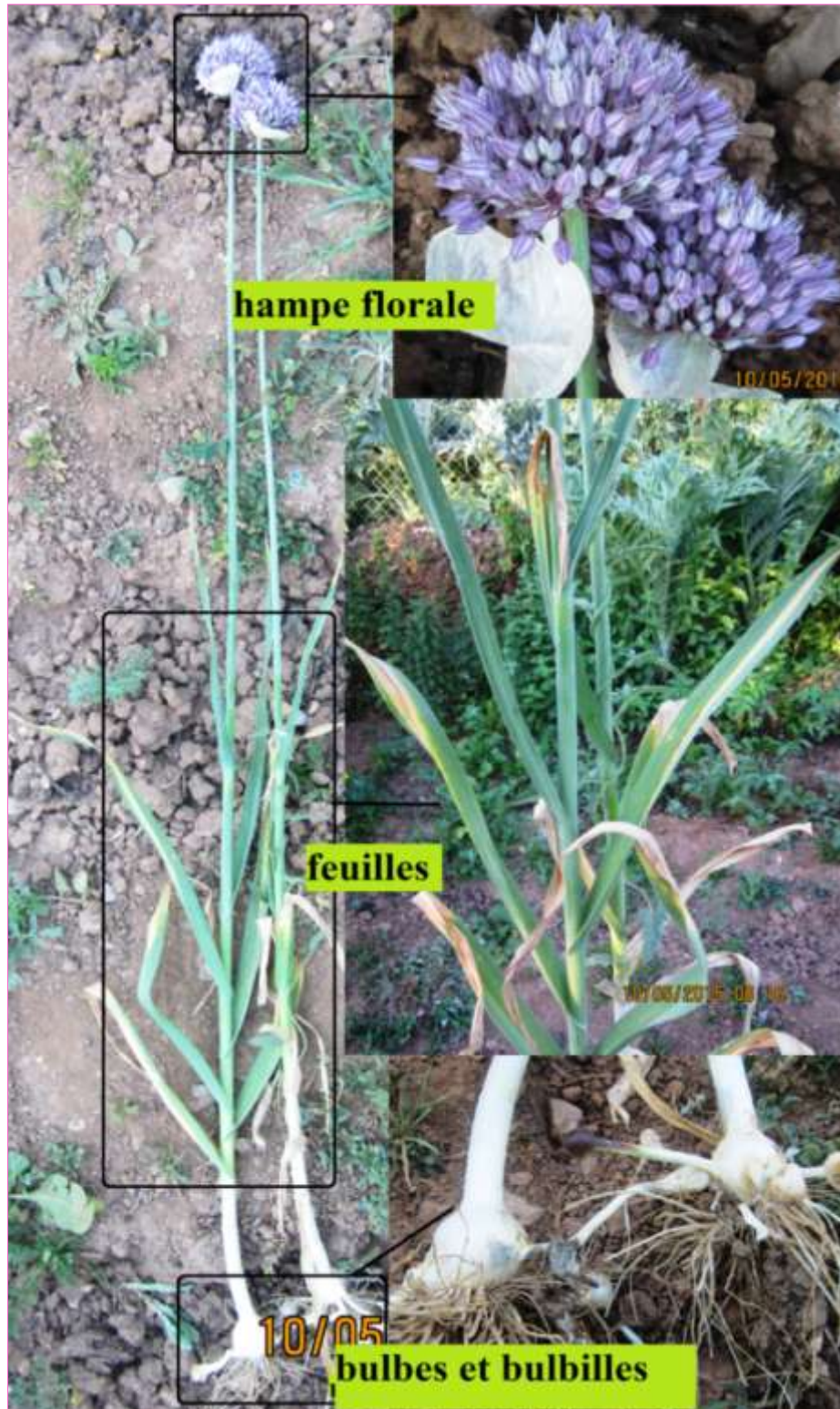


Figure 05: *Allium ampeloprasum* (Tizi Gheniff, 2015)

2.3.2. Taxonomies et systématiques

Classification de Cronquist (1981)

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Liliopsida
Sous-classe	Liliidae
Ordre	Liliales
Famille	Liliaceae
Genre	<i>Allium</i>
Espèce	<i>ampeloprasum</i>

Classification APG III (2009)

Ordre	Asparagales
Famille	Amaryllidaceae
Sous-famille	Allioideae

2.3.3. Habitat et répartition géographique

Elle se trouve dans des Champs, broussailles et pâturages (QUEZEL et SANTA, 1962), en Europe méridionale, Asie occidentale jusqu'à l'Iran et Égypte. La Ssp. *Porrum* est cultivé dans le monde entier, les Var. *gracile*, *Duriaeanum*, *getulum* et *tortifolium* sont spécifiques de l'Afrique du Nord (MAIRE, 1958).



Partie 02

Chapitre 03



**Matériel et
méthodes**

3.1. Échantillonnage

Pour notre étude, nous avons récolté 15 individus appartenant à trois espèces du genre *Allium* dans des stations différentes (tableau 2). L'échantillonnage a été effectué de manière aléatoire (cinq plantes ont été prélevées pour chacune des espèces, et la distance entre les individus est supérieure à 1.5 m). Les plantes sont récoltées au mois de mai 2015.

Description des stations d'échantillonnage

La commune de Tizi Gheniff est située à 47 km au sud-ouest de la wilaya de Tizi Ouzou. La commune de Tirmatine est localisée à 7 km à l'ouest de la wilaya. Les trois stations sont orientées vers le nord (fig. 06).

Les altitudes, les latitudes et longitudes de ces deux stations sont indiquées dans le tableau 03.

Tableau 03 : Données GPS des stations

station	Latitude	Longitude	Altitude
Tizi Gheniff récolte d' <i>A. sativum</i>	36.6922	3.7870	585 m (+/-2)
Tizi Gheniff récolte d' <i>A. ampeloprasum</i>	36.6078	3.7880	569 m (+/- 2)
Tirmatine récolte d' <i>A. roseum</i>	36.6922	3.9796	115 m (+/- 2)



Figure 06 : localisation des stations d'échantillonnage.



Figure 07: *Allium sativum* (Tizi Gheniff, 2015).



Figure 08: *Allium ampeloprasum* (Tizi Gheniff, 2015).



Figure 09 : *Allium roseum* (Tirmitine, 2015).

3.2. Le matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est constitué de feuilles séchées de trois espèces de genre *Allium* (*A. ampeloprasum*, *A. roseum*, *A. sativum*). Elles ont été authentifiées en les comparant à la description établie par QUEZEL et SANTA (1962).

3.3. La souche bactérienne

Le support bactérien est constitué d'une seule souche pathogène *Staphylococcus aureus* fournie par le laboratoire microbiologie de l'UMMTO.

3.4. Extraction des flavonoïdes

Nous avons utilisé la technique d'hydrolyse acide à chaud de la poudre végétale. Elle a été mise au point par Bate-Smith (1954), reprise par Lebreton (1967) puis par Jay et al. (1975) et enfin améliorée par Laracine (1984). Cette technique permet l'extraction et la séparation des flavonoïdes et d'obtenir deux types de composés :

- ♣ Épiphasse étherée : elle contient les aglycones (flavones et flavonols) et les acides phénols. Elle est récupérée après chaque extraction dans une boîte de Pétri et évaporée à l'air libre. Le résidu sec est repris dans 10 ml d'éthanol, puis conservé au frais avant d'être soumis à une analyse quantitative par spectrophotométrie.
- ♣ Hypophase acide : elle contient les anthocyanes, les C-glycosides et les oses simples. Elle est récupérée et additionnée à 35 ml de 1-butanol.

Pour chacune des trois espèces, nous avons utilisé les feuilles de 5 individus. Ces dernières ont été découpées puis séchées à l'étuve à une température de 25° C pendant une semaine. Elles ont été ensuite pulvérisées avec un broyeur électrique.

3.4.1. Analyses quantitatives

La méthode utilisée est celle de colorimétrie basée sur la propriété de certains composés qui absorbent d'avantage la lumière à des longueurs d'ondes spécifiques dans le spectrophotomètre UV-visible (Plummer, 1989). Elle permet de réaliser des dosages grâce à la loi de Beer Lambert :

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

3.4.1.1. Dosage des proanthocyanes

La lecture des extraits s'établit par spectrophotométrie à 520 nm. La teneur absolue (T) en anthocyanes est calculée par la formule suivante dont le coefficient correctif, est égal à 6 (Leberton 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

3.4.1.2. Dosage des C-glycosylflavones

La lecture des extraits s'établit également par spectrophotométrie à 340 nm 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 méthanoïque ; d : facteur de dilution ; p : poids sec du matériel végétal hydrolysé

3.4.1.3. Dosage des aglycones flavoniques

Les flavonoïdes ayant un hydroxyle (-OH) libre en position 3 et 5 réagissent avec les métaux. Le chlorure d'aluminium (AlCl₃) 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'AlCl₃ (extrait étheré + AlCl₃ dans l'éthanol 95°).

La solution d'AlCl₃ 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 type.

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

$$T \text{ (mg/g)} = 1,3 \cdot 10^{-2} \cdot \Delta DO \cdot V \cdot d / p$$

ΔDO : densité optique au pic différentiel égale à $DO(AlCl_3) - D.O$ (éthanol 95°) ; 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.

3.4.2. Étude statistique

Les résultats des teneurs absolues en phénols des extraits étudiés (Annexe 03) sont soumis à une analyse de la variance effectuée avec le logiciel Statistica (Annexe 08).

3.5. Activité biologique

Les activités étudiées sont l'activité microbienne et l'activité antioxydante des flavonoïdes extraits.

3.5.1. Étude de l'activité antibactérienne

Nous avons étudié le pouvoir antibactérien des extraits, par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solide (Muller Hinton) décrit par BROADASKY et *al.* (1976).

L'activité antibactérienne de nos extraits est estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition apparaissant autour des disques contenant la substance à tester vis à vis de *Staphylococcus aureus*. Des conditions d'aseptie rigoureuses ont été adoptées. Ainsi notre travail a été effectué entre deux bacs bunsen (LESUEUR et *al.*, 2007).

3.5.1.1. Protocole expérimental

3.5.1.1.1. Préparation de l'inoculum

Après incubation de la souche bactérienne pendant 24 heures à 37 °C, nous avons prélevé 4 à 5 colonies bien isolées, que nous avons transférées avec une anse, pour obtenir une suspension bactérienne dans un tube à essai contenant de l'eau distillée stérile afin d'avoir une densité cellulaire initiale ou une turbidité voisine de celle de Mc Farland 0,5 (10^6 UFC/ml). Cette turbidité est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 625 nm, la densité optique doit être de 0,08 à 0,1.

3.5.1.1.2. Ensemencement

Des boîtes de Pétri stériles contenant du milieu Mueller Hinton, sontensemencées par la suspension bactérienne dans les 15 minutes après l'ajustement de la turbidité de la suspension servant d'inoculum. Des écouvillons sont trempés dans la suspension bactérienne. Les bactéries sont étalées à la surface de la gélose, en tournant la boîte à environ 60°. Après chaque application, on pivote l'écouvillon sur lui-même, l'ensemencement se termine en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose. Dans le but d'avoir une distribution égale de l'inoculum. Il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

3.5.1.1.3. Application des disques d'antibiogramme

Avec une pince stérile, nous avons transposé délicatement dans chaque boîte 5 disques de papier Wathman n°1 stérile de 6 mm de diamètre. A l'aide d'une micropipette 10 µl de chacune des solutions mères des flavonoïdes extraits sont prélevés pour imprégner les disques confectionnés comme suit :

- ♣ Un disque imbibé seulement par du DMSO comme témoin négatif (T⁻)
- ♣ Un disque d'AMP imbibé du DMSO (T⁺)
- ♣ 3 disques imbibés avec des doses de flavonoïdes

Les boîtes sont laissées pendant 1 heure à la température ambiante pour une rediffusion des substances, avant d'être incubées à 37° C à l'étuve pendant 24 heures (ADESOKAN *et al.*, 2007).

3.5.1.1.4. Expression des résultats

Après incubation pendant 24 h à 37°C, l'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant, à l'aide d'une règle, le diamètre de la zone d'inhibition (Annexe 06). Les valeurs des mesures obtenues sont comparées aux valeurs critiques.

Nous avons classé la sensibilité montrée par la bactérie vis-à-vis des extraits dans l'une des catégories selon le diamètre moyen de la zone d'inhibition (BOUHARB, 2003) :

- ♣ Non sensible (résistante) $\emptyset \leq 8$ mm
- ♣ Sensible $9 \leq \emptyset \leq 14$ mm
- ♣ Très sensible $15 \leq \emptyset \leq 19$ mm
- ♣ Extrêmement sensible $\emptyset \geq 20$ mm

3.5.1.2. Étude statistique

L'ensemble des résultats obtenus sont soumis à une analyse de la variance à $p = 5\%$ nous servant du logiciel Statistica (Annexe 08).

3.5.2. Activité antioxydante des différents extraits flavoniques

Afin d'étudier l'activité antiradicalaire de nos extraits, nous avons utilisé le protocole décrit par MARINOVA *et al.* (2011). Cette méthode est basée sur la réduction du radical libre le DPPH (2,2'-Diphényl-1-picryl hydrazyl) par des antioxydants donneurs de protons d'hydrogène.

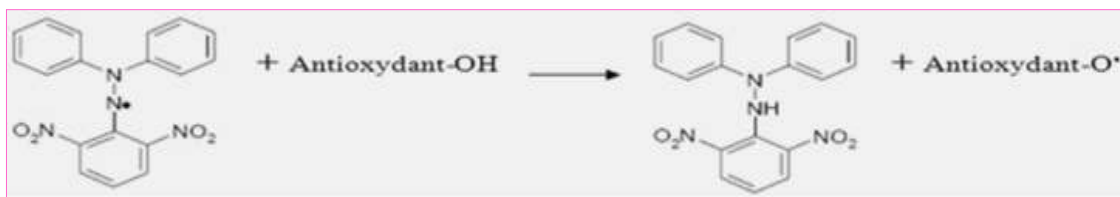


Figure 10 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.

Une solution de DPPH dans le méthanol se colore en violet intense qui absorbe la lumière à 517 nm. L'absorbance diminue et la couleur disparaît progressivement en accord avec la réduction du DPPH par les antioxydants le pouvoir antioxydant de nos extraits est inversement proportionnel à l'estompement de la couleur violette du DPPH. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition (réduction) du DPPH (I%) calculé par la formule :

$$I\% = 100 \times \frac{A \text{ blanc} - A \text{ echantillon}}{A \text{ blanc}}$$

Pour l'évaluation de l'activité, nous avons préparé une gamme de dilutions allant de 0 à 200 µg/ml à partir de nos extraits. Leur activité antioxydante a été évaluée par la mesure des densités optiques et de tracer des courbes d'allure en exponentielle pour chacun des extraits utilisés.

4.1. Extraction par hydrolyse acide des quatre classes phénoliques

Les résultats des dosages des teneurs absolues des substances phénoliques (proanthocyanes, C-glycosylflavones, aglycones flavones et les aglycones flavonols) extraites des feuilles des trois espèces étudiées, sont matérialisés par la figure 11 et groupés dans le tableau 01 (annexes 03 et 05).

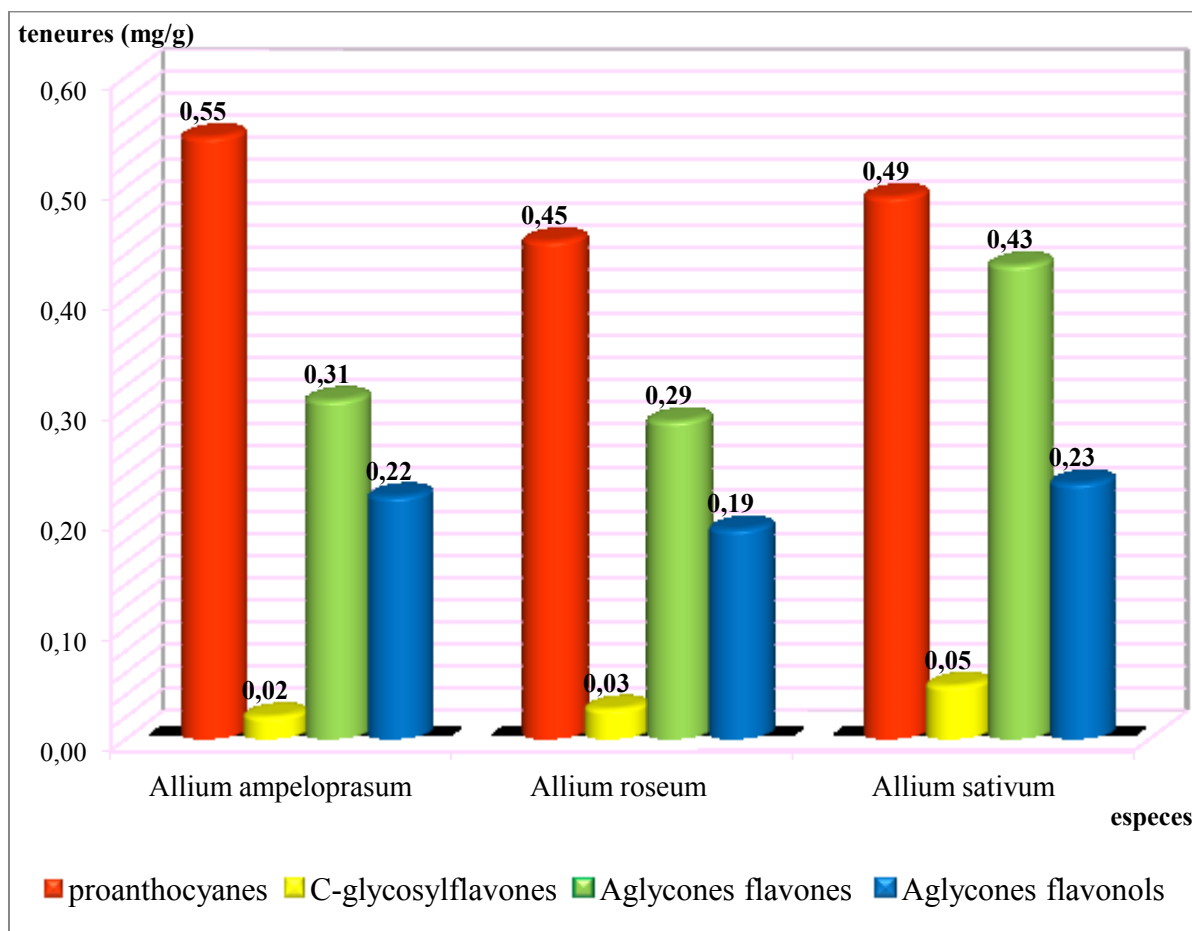


Figure 11 : teneurs absolues moyennes des quatre classes étudiées de nos trois *Allium*

4.1.1. Cas d'*Allium sativum*

Les teneurs absolues moyennes des classes phénoliques d'*A. sativum*. La valeur la plus importante a été révélée par les proanthocyanes avec $0,491 \pm 0,088$ mg/g, viennent ensuite les aglycones flavones ($0,429 \pm 0,079$ mg/g), puis les aglycones flavonols ($0,232 \pm 0,055$ mg/g) et enfin les C-glycosylflavones avec une valeur faible ($0,048 \pm 0,020$ mg/g)

4.1.2. Cas d'*Allium ampeloprasum*

Les teneurs absolues moyennes des classes phénoliques d'*A. ampeloprasum*. La valeur la plus importante a été révélée par les proanthocyanes avec ($0,545 \pm 0,066$ mg/g), après les

aglycones flavones ($0.307 \pm 0,043$ mg/g) ensuite les aglycones flavonols ($0.219 \pm 0,051$ mg/g) et en fin les C-glycosylflavones avec une valeur faible ($0.020 \pm 0,004$ mg/g).

4.1.3. Cas d'*Allium roseum*

Les teneurs absolues moyennes des classes phénoliques d'*A. roseum*. La valeur la plus importante révélée par les proanthocyanes avec ($0,451 \pm 0,098$ mg/g), ensuite les aglycones flavones ($0.288 \pm 0,057$ mg/g) après les aglycones flavonols ($0.190 \pm 0,040$ mg/g) et en fin les C-glycosylflavones avec une valeur faible ($0.027 \pm 0,008$ mg/g).

4.1.4. Dosage des protoanthocyanes chez les trois espèces du genre *Allium*

Les teneurs absolues moyennes en proanthocyanes chez les trois espèces de bulbeuses étudiées. Les teneurs sont relativement proches avec ($0,545 \pm 0,066$ mg/g) chez d'*A. ampeloprasum* suivi par *A. sativum* ($0.491 \pm 0,088$ mg/g) puis vient d'*A. roseum* ($0,451 \pm 0,098$ mg).

4.1.5. Dosage des C-glycosylflavones chez les trois espèces d'*Allium*

Les teneurs absolues moyennes des C-glycosylflavones des espèces d'*Allium* étudié. La teneur la plus importante est révélée par d'*A. sativum* ($0.048 \pm 0,020$ mg/g), suivi par *A. roseum* ($0.027 \pm 0,008$ mg/g), puis vient d'*A. ampeloprasum* ($0.020 \pm 0,004$ mg).

4.1.6. Dosage des aglycones flavonols chez les trois espèces d'*Allium*

Les teneurs absolues moyennes des aglycones flavonols des espèces d'*Allium* étudié. La teneur la plus importante est révélée par d'*A. sativum* ($0.232 \pm 0,055$ mg/g), suivi par *A. ampeloprasum* ($0.219 \pm 0,051$ mg/g), puis vient d'*A. roseum* ($0.190 \pm 0,040$ mg).

4.1.7. Dosage des aglycone flavones chez les trois espèces d'*Allium*

Les teneurs absolues moyennes des aglycones flavones des espèces d'*Allium* étudié. La teneur la plus importante est révélée par d'*A. sativum* ($0.429 \pm 0,079$ mg/g), suivi par *A. ampeloprasum* ($0.307 \pm 0,043$ mg/g), puis vient d'*A. roseum* ($0.288 \pm 0,057$ mg).

4.1.8. Discussion

L'ensemble des résultats obtenu dans cette étude sont en conformité avec de nombreuses études qui ont rapporté que les feuilles et les fleurs sont les plus riches en termes de polyphénols totaux. La caractérisation des flavonoïdes extraits a été effectuée par dosage par la méthode du trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) (BAHORUN *et al.*, 1996) cette méthode a montre que les feuilles de *A. sativum*, *A. roseum* et *A. ampeloprasum* sont riches en proanthocyanes. Le Test Univarié de Significativité pour la teneur de nos extraits en

différentes classes de flavonoïdes, nous permet de conclure à l'existence d'une différence significative pour le facteur classe phénolique ($p=0.000$) et le test de Newman-Keuls pour le facteur classes phénoliques montre qu'il y a quatre groupes homogènes groupe A : C-glycosylflavones, groupe B : aglycones flavonols et groupe C : aglycones flavones, groupe C : proanthocyanes

L'accumulation des polyphénols dans certains organes serait due à leur pouvoir protecteur contre certains facteurs abiotiques connus comme les radiation UV (ZOUARI *et al.*, 2012). Néanmoins *A. sativum* reste celle qui a montré la plus forte teneur comparé aux deux autres espèces. Le Test Univarié de Significativité pour la teneur de nos extraits en différentes classes de flavonoïdes, nous permet de conclure qu'il y a une différence significative pour le facteur espèce ($p = 0.01734$). mais il n'y a pas de différence significative pour l'interaction des deux facteurs espèce végétale-classe phénolique ($p=0.08579$).

La teneur en flavonoïdes peut différer d'une espèce à une autre et d'un organe végétal à un autre. Ces observations pourraient s'expliquer par l'influence de plusieurs facteurs, tels que, l'origine géographique et le stade de croissance. De nombreux auteurs comme NAZK *et al.* (2004) s'accordent sur le fait que la synthèse et l'accumulation des polyphénols dans la plante sont généralement stimulées par des stress biotique et abiotique comme les rayonnements UV (WINKEL-SHIRLEY, 2002).

4.2. Activité antibactérienne des différentes classes de flavonoïdes extraits

4.2.1. Résultats

Les résultats des mesures des diamètres des zones d'inhibition obtenue avec les différents extraits considérés en présence de *S. aureus* sont groupés dans le tableau 04 et matérialisés par la Fig. 17. Nous remarquons que la souche est résistante au DMSO (T) et sensible à l'ampicilline (T⁺) (diamètre moyen égal à 10 mm). *Staphylococcus aureus* (Gram+) est également sensible aux C-glycosylflavones d'*A. roseum* (diamètre moyen de 13 mm) et aux aglycones d'*A. ampeloprasum* et *A. sativum* dont les diamètres moyens respectifs sont de 18.667 et 19.33 mm (Fig. 14 et 15). Cette bactérie s'est montrée très sensible aux C-glycosylflavones de *A. sativum* (fig. 11) et *A. ampeloprasum* (diamètres moyens obtenus sont de 15,33 et 16,66mm). Ce sont les proanthocyanes extraits des trois bulbeuses qui ont exercé l'effet inhibiteur le plus important sur la croissance de *S. aureus* étant donné que les diamètres moyens respectifs des zones d'inhibition obtenus sont de 22, 23 et 24,33 mm (fig. 13 et 14). Les aglycones d'*A. roseum* sont tout aussi efficaces avec l'induction d'un diamètre moyen de la zone d'inhibition de 20 mm (fig.16)

Tableau 04 : Diamètres moyens des zones d'inhibition (mm) obtenues avec les deux souches

Souche bactérienne	Espèces	Classes phénoliques	Moyenne ± Écart type (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i> (Gram+)	<i>Allium ampeloprasum</i>	proanthocyanes	23,000 ± 2,449
		C-glycosylflavones	16,667 ± 2,494
		Aglycones	18,667 ± 3,091
		T ⁺	10±00
		T ⁻	00
	<i>Allium roseum</i>	proanthocyanes	23,000 ± 2,160
		C-glycosylflavones	13,000 ± 2,160
		Aglycones	20,000 ± 0,816
		T ⁺	10±00
		T ⁻	00
	<i>Allium sativum</i>	proanthocyanes	24,333 ± 3,091
		C-glycosylflavones	15,333 ± 0,471
		Aglycones	19,333 ± 0,943
		T ⁺	10±00
		T ⁻	00

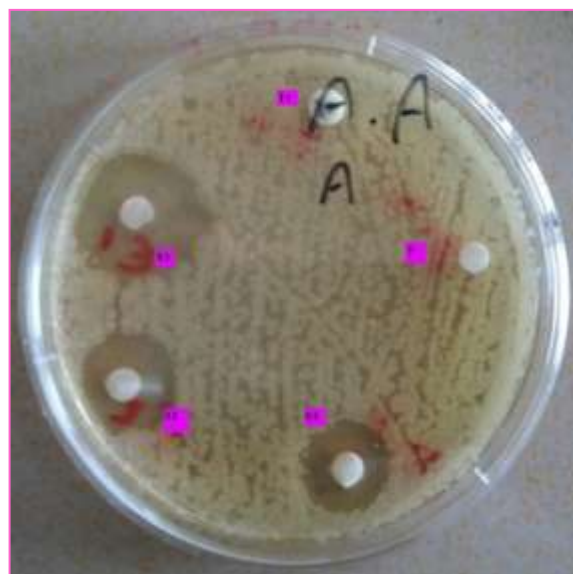
**Figure 11** : Zone d'inhibition des C-glycosylflavones d'*A. sativum* en présence *S. aureus*.**Figure 12** : Zone d'inhibition des proanthocyanes d'*A. ampeloprasum* en présence *S. aureus*



Figure 13 : Zone d'inhibition des proanthocyananes d'*A. sativum* en présence de *S. aureus*.



Figure 14 : Zone d'inhibition des aglycones d'*A. ampeloprasum* en présence de *S. aureus*.



Figure 15: Zone d'inhibition des aglycones d'*A. sativum* en présence de *S. aureus*.

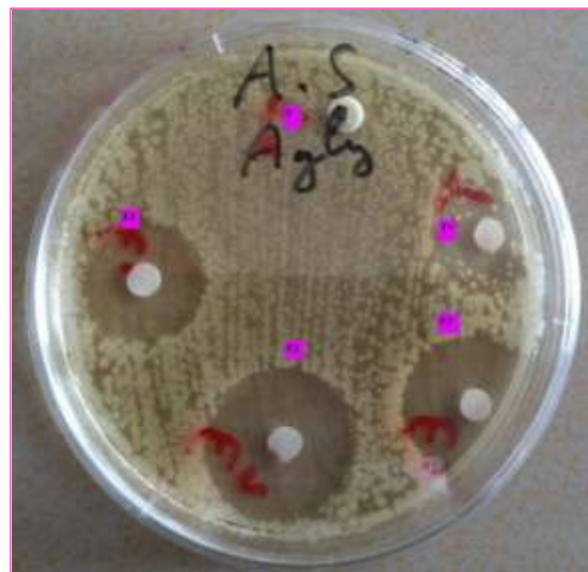


Figure 16 : Zone d'inhibition des aglycones d'*A. roseum* en présence de *S. aureus*

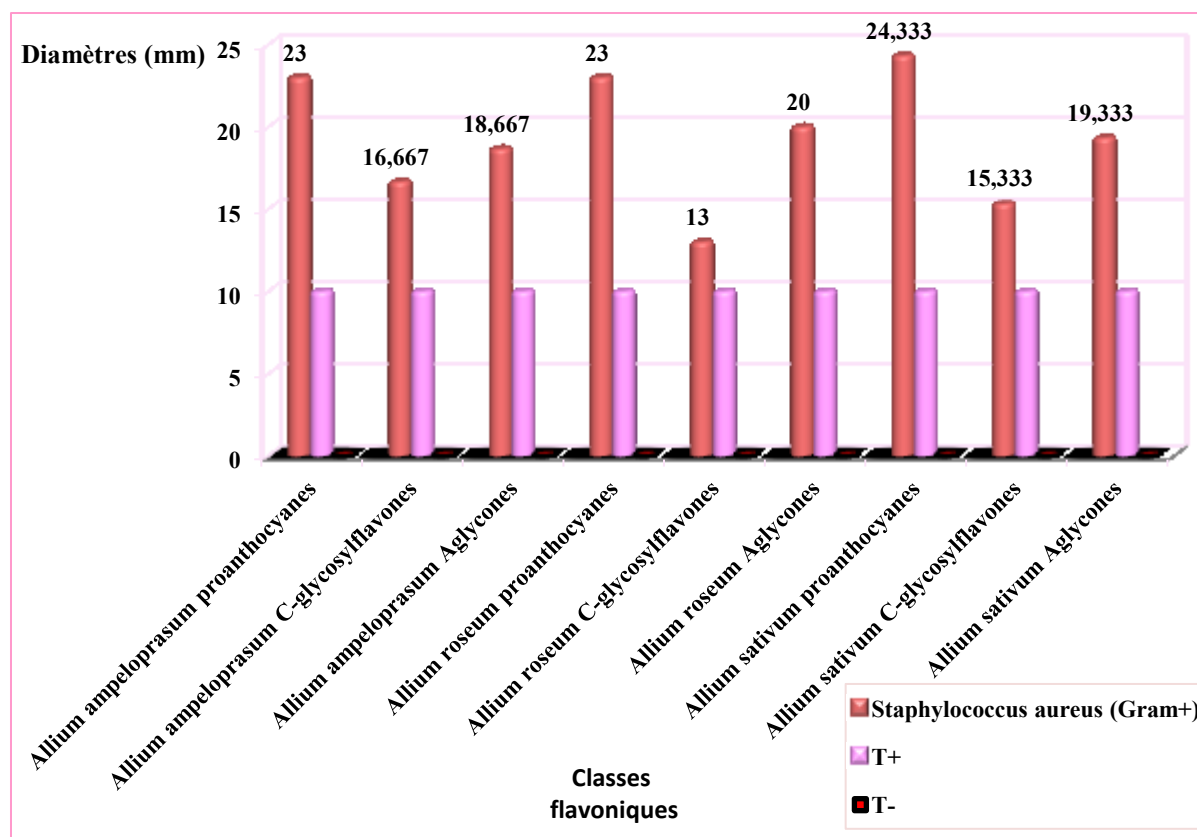


Figure 17 : Diamètres moyens des zones d'inhibition induites par les extraits des feuilles des trois espèces d'*Allium* provenant de Kabylie.

4.2.2. Discussion

L'activité antibactérienne des quatre classes de flavonoïdes estimée par la mesure des diamètres des zones d'inhibition apparues autour des disques contenant les produits flavoniques testés vis-à-vis d'une souche bactérienne pathogène *Staphylococcus aureus* (Gram+), après 24 heures d'incubation à 37°C ont révélé des résultats fort intéressants. Les souches bactériennes se sont comportées différemment en fonction de l'extrait mis en leur présence.

Pour *S. aureus*, c'est la fraction proanthocyanes qui a montré des zones d'inhibition les plus importantes avec 24,333 mm chez *A. sativum*, 23 mm pour *A. roseum* et 23 mm pour *A. ampeloprasum*, ensuite viennent les aglycones avec des diamètres de zone d'inhibition de 19,33 pour *A. sativum*, 20 mm pour *A. roseum* 20 mm et 18,66 mm *A. ampeloprasum*. La fraction des C-glycosylflavones est celle qui a eu l'effet le moins important avec des diamètres de 16,667 mm pour *A. ampeloprasum*, 15,333 mm pour *A. sativum* et 13 mm pour *A. roseum*, et ce chez les trois espèces d'*Allium*. Ce résultat est conforté par le test Univarié de Significativité pour le diamètre de zone d'inhibition de nos extraits, nous constatons qu'il y

a une différence significative pour le facteur classe phénolique ($p=0.000001$). Le test de Newman-Keuls pour le variable diamètre de zone d'inhibition des extraits flavoniques montre pour le facteur classes l'existence de trois groupes homogène, groupe A : C-glycosylflavones ; groupe B: aglycones ; groupe C : proanthocyanes.

Les flavonoïdes extraits se sont comportés de la même manière en inhibant la croissance radiale de *S. aureus*. En effet, ce résultat est confirmé par le test uni varié qui n'a aucun différence significative pour le facteur espèce végétale ($p=0.273404$). Le test de Newman-Keuls pour la variable diamètre de zone d'inhibition des extraits flavoniques montre pour le facteur espèce végétale montre l'existence de deux groupes homogènes groupe A : *A. roseum* et *A. ampeloprasum*, groupe B : *A. ampeloprasum* et *A. sativum*.

Le test de Newman-Keuls pour la variable diamètre de zone d'inhibition des extraits flavoniques montre pour l'interaction souche-classes phénoliques l'existence de trois groupes homogène, groupe A : *S. aureus*-C-glycosylflavones ; groupe B : *S. aureus*-aglycones ; groupe C : *S. aureus*-proanthocyanes.

Les résultats ainsi obtenus pourraient être expliqués par le fait que les proanthocyanes et les aglycones sont des flavonoïdes dépourvus de groupements hydroxyles libres par rapport à l'autre classe de flavonoïdes testée les C-glycosylflavones pourvus de groupement hydroxyles libres. Les proanthocyanes et les aglycones voient donc leur affinité chimique aux lipides membranaire augmenter et ciblent la membrane cytoplasmique de l'agent pathogène testé.

Cette étude a montré que les différentes fractions de flavonoïdes testées agissent différemment vis-à-vis de la bactérie à laquelle elle est confrontée directement en boîtes de pétri. En effet, un composé peut agir de manière importante sur un microorganisme ou induire une action moindre, voire nulle comme rapporté par KAROU et al. (2005). Ces derniers attribuent l'activité antibactérienne des flavonoïdes aux mécanismes de toxicité développés par ces composés en agissant par des interactions non spécifiques telles que l'établissement de ponts hydrogènes avec les protéines des parois cellulaires ou les enzymes, la chélation des ions métalliques, inhibition du métabolisme bactérien ou alors en séquestrant les substances nécessaires à la croissance bactérienne. Les activités antibactériennes des extraits insolubles dans l'eau sont comparables à l'activité de l'antibiotique utilisé dans notre test l'ampicilline.

Les différentes classes flavoniques testées ont inhibé la croissance de *S. aureus* ce résultats concorde avec celui de KALLEL et al. (2014) on trouve qu'une souche de *S. aureus*

s'est montré la plus sensible aux extraits d'*Allium sativum* avec une concentration minimal d'inhibition de 2 mg/ml. Les résultats que nous avons obtenus semblent importants étant donné que *S. aureus* est associé à de nombreuses maladies infectieuses en produisant différents types d'enterotoxines qui causent les gastroentérites qui constituent un problème mondial dans les aliments et en chirurgie (HALPIN-DOHNALEK et MARTH, 1989).

Différents mécanismes ont été proposés pour expliquer l'activité antimicrobienne des polyphénols. Ils dépendent des enzymes microbiennes extra cellulaires inhibitrices, l'inhibition de la croissance par la séquestration des substrats nutritifs ou en agissant directement sur le métabolisme par inhibition des réactions de phosphorylation oxydative (HEINONEN, 2007)

L'acide ferulique et caféique pourraient être les composés responsables de l'activité antimicrobienne générée par des extraits flavoniques (KALLEL et al., 2014)

4.3. Activité antioxydante

4.3.1. Résultats

Le suivi de l'activité réductrice de radicaux libres DPPH, nous a permis d'obtenir les résultats consignés dans le 03 tableau n matérialisés par les figures 25, 26, 27, 28, 29 et 30

La méthode de DPPH est une méthode rapide et simple pour évaluer la capacité antioxydante. Nos résultats ont montré que les différents extraits et le standard acide gallique possédant des aptitudes à réduire le radical libre DPPH de la nuance violette au radical stable jaune DPPH-H, le standard utilisé est l'acide gallique présent un pouvoir scavenger important de l'ordre 98%.

Les aglycones d'*A. sativum* semblent être ceux de qui ont inhibé le plus le radical libre DPPH, avec plus de 93 % de réduction du DPPH. (fig. 18).

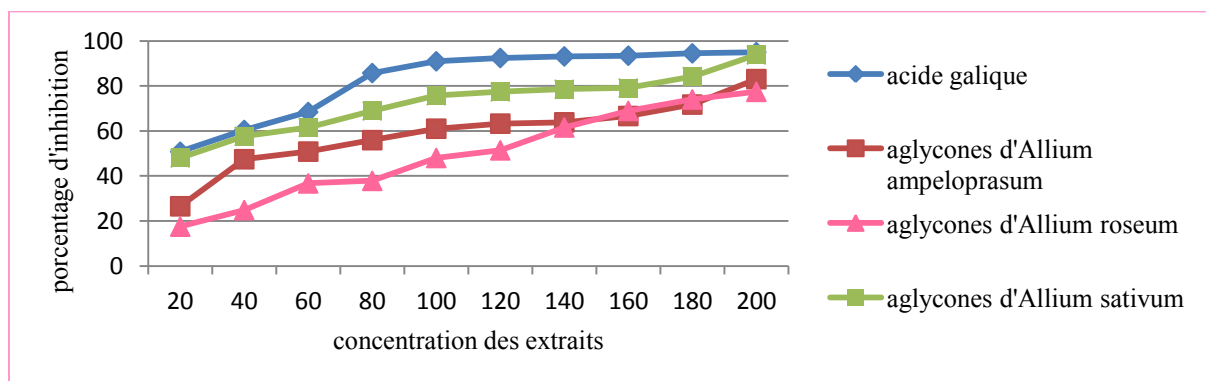


Figure 18 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations en aglycones

Les anthocyanes provenant des feuilles de trois espèces du genre *Allium* se sont montrés une activité assez importante vis-à-vis du radical libre DPPH avec un taux de réduction de 77% atteint par celles extraites à partir d'*A. ampeloprasum* (fig. 19).

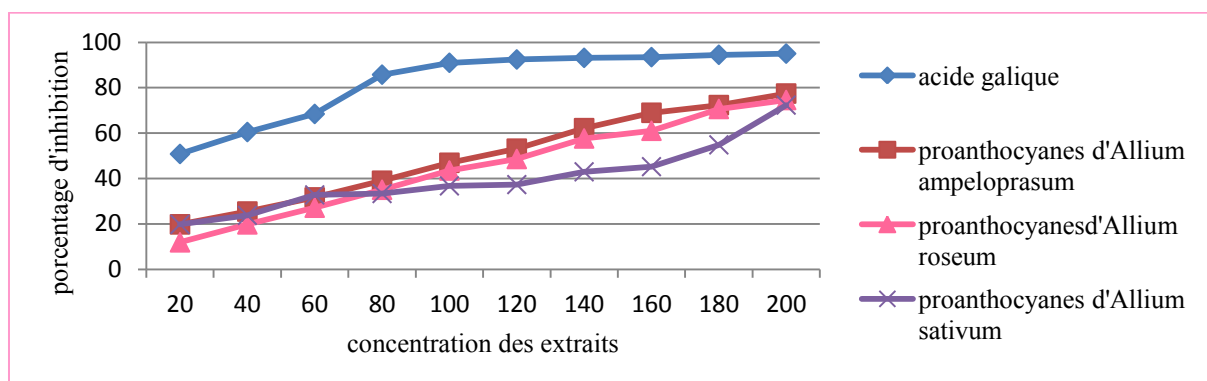


Figure 19 : Pourcentage d'inhibition de radical libre DPPH en fonction des concentrations en proanthocyanes.

L'effet inhibiteur le plus faible a été enregistré avec les C-glycosylflavones d'*A. roseum* (64.406%) et C-glycosylflavones d'*A. ampeloprasum* (69.491 %) (fig. 20).

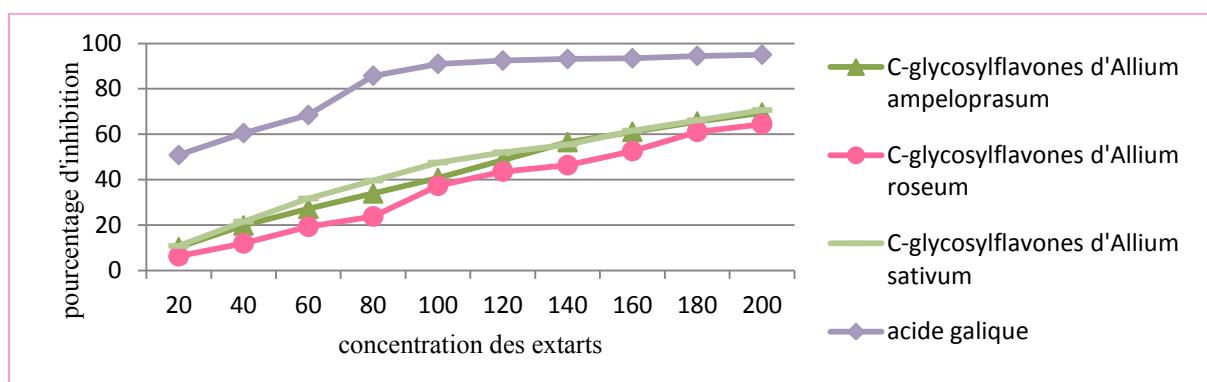


Figure 20 : Pourcentage d'inhibition de radical libre DPPH en fonction des concentrations en C-glycosylflavones.

Les aglycones de *A. ampeloprasum* sont ceux qui ont révélé la plus forte activité antioxydante parmi les trois classes de flavonoïdes extraites avec 83% alors que les C-glycosylflavones ont montré l'activité la plus faible avec un taux de réduction de 70% (fig. 21).

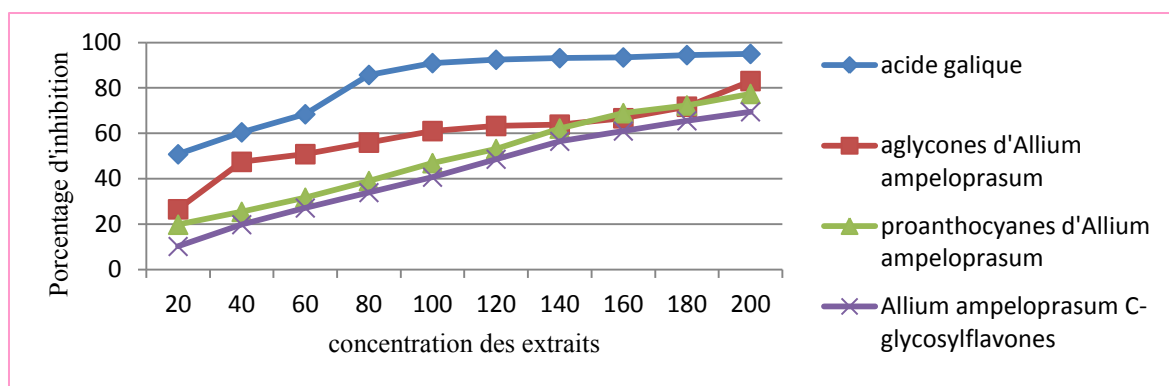


Figure 21 : Pourcentage d'inhibition de radical libre DPPH en fonction des concentrations chez *A. Ampeloprasum*

Les trois classes de flavonoïdes d'*A. roseum* ont montré une activité anti radicalaire comprise entre 64% pour les C-glycosylflavones et 77% pour les aglycones (fig. 22).

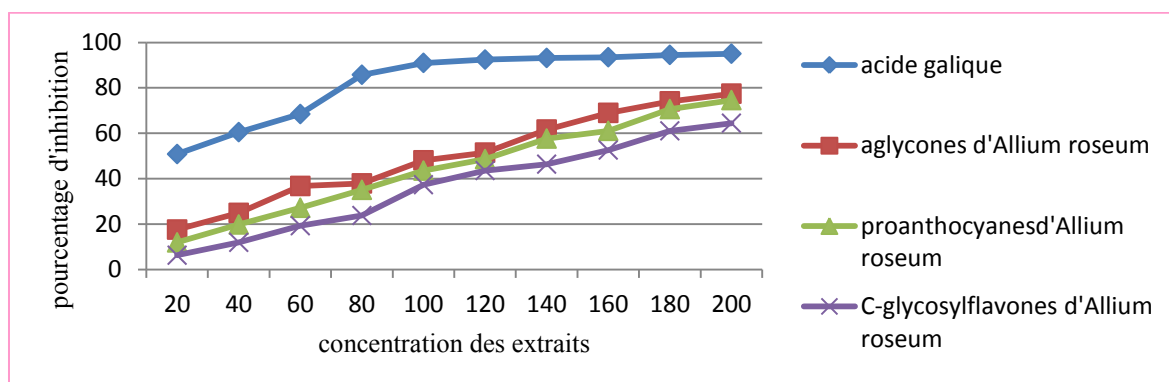


Figure 22 : Pourcentage d'inhibition de radical libre DPPH en fonction de concentrations chez *A. roseum*

Les flavonoïdes d'*A. sativum* ont réagi différemment en présence du DPPH. En effet, l'activité la plus importante avec un taux atteignant les 93% dans le cas des aglycones, fig.23.

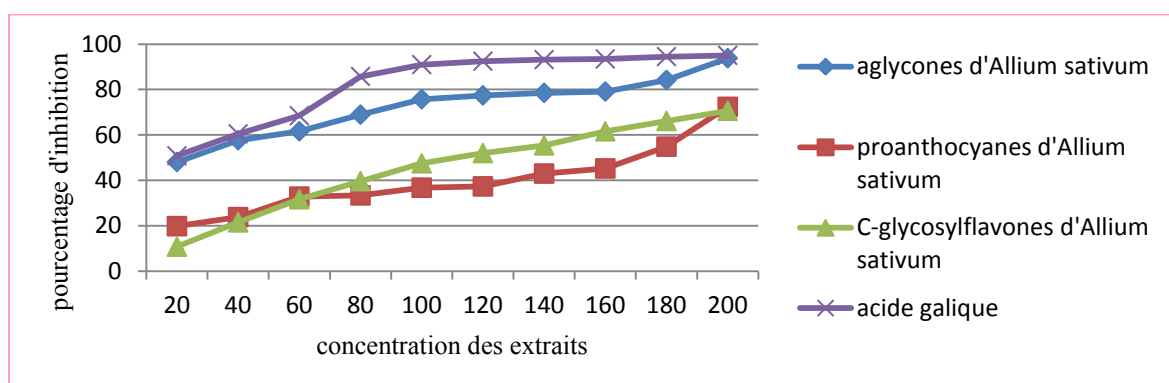


Figure 23 : Pourcentage d'inhibition de radical libre DPPH en fonction de concentrations chez *A. sativum*

4.3.2. Discussion

Les résultats obtenus (fig. 26,27, 28, 29, 30, 31, 32) montrent que les quatre classes de flavonoïdes réduisent d'une manière significative dose-dépendante le radical DPPH.

Globalement l'acide gallique s'est montré plus actif vis à vis du DPPH comparé aux différentes classes de flavonoïdes extraits avec 95% de la réduction du radicale libre DPPH.

Ces résultats confirment ceux de HERRERA et *al.* (2014) qui ont rapporté que ce sont les tiges et les feuilles d'*A. ampeloprasum* qui présentent la capacité la plus importante pour neutraliser ce radicale libre (DPPH). En effet ils ont pu déterminer une valeur de 137 ± 1.7 et $131.66 \pm 2,9$ $\mu\text{g/ml}$ alors que les bulbes ont montré la plus faible activité antiradicalaire avec une IC_{50} de 920 ± 5 $\mu\text{g/ml}$.

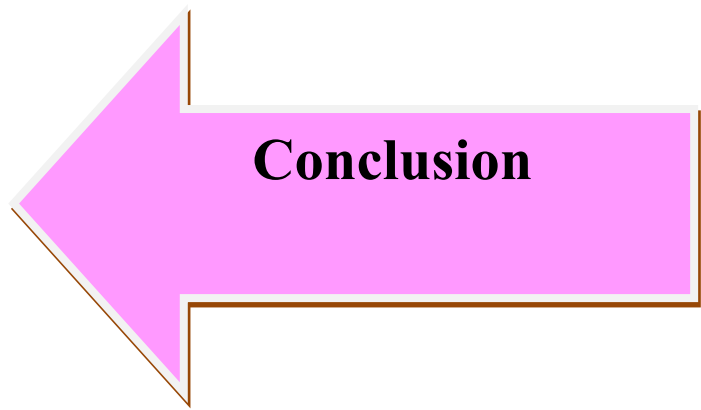
Ces résultats confirment également ceux d'autres auteurs rapportés par la littérature. En effet, NENCINI et *al.* (2011) ont révélé que le pouvoir anti-DPPH le plus important a été montré par les fleurs et les feuille d'*A. neapolitanum* et *A. roseum* mais seulement une très faible activité pour les bulbes et les bulbilles. Des résultats similaires on été également rapportés pour les extrait méthanoïque des feuillies d'*A. sativum* échantillonnées a partir d'une zone aride a BenGardane au Sud Est de Tunisie. Ces résultats jettent la lumière sur le rôle des flavonoïdes comme composes antioxydants potentiels. En effet, les flavonoïdes sont connus pour prévoir les dommages causés par les radicaux libres former à la suite de nombreux mécanismes telles que la réduction directe des espèces réactives d'oxygène (ROS), activation d'enzymes antioxydantes , la chélation de métaux, la réduction des radicaux d' α -tocopheryl, inhibition d'oxydase et élévation des propriétés antioxydantes relatives aux molécules antioxydantes (PROCHAZKOVA et *al.*, 2011).

les polyphénols révèlent chez les trois espèces d'*Allium* pourraient avoir une activité antioxydante par leur capacités à chélater les métaux et délocaliser les charges électriques provenant des radicaux libre (SEBRA et *al.*, 2006).

Chapitre 04



**Résultats et
discussion**



Au cours de cette étude, quatre classes de flavonoïdes contenus dans les feuilles réduites en poudre de trois espèces d'*Allium* (*Allium sativum*, *A. ampeloprasum* et *A. roseum*) ont été extraits par la technique d'hydrolyse acide à chaud. Quantifiés par colorimétrie, les proanthocyanes se sont révélés les plus abondants chez d'*A. ampeloprasum*, suivi par *A. sativum*, puis vient d'*A. roseum* ensuite les aglycones flavones, suivi par *A. ampeloprasum*, puis vient d'*A. roseum*, puis les aglycones flavones (d'*A. sativum*, suivi par *A. ampeloprasum*, puis vient d'*A. roseum* et enfin les C-glycosylflavones avec une valeur faible (*A. sativum*, suivi par *A. roseum*, puis vient d'*A. ampeloprasum*).

Les teneurs les plus élevées caractérisent *A. sativum* (proanthocyanes, les aglycones flavones, aglycones flavonols et C-glycosylflavones, vient ensuite *A. ampeloprasum* (proanthocyanes, aglycones flavones, aglycones flavonols et C-glycosylflavones et en dernier *A. roseum* (proanthocyanes, aglycones flavones, aglycones flavonols et C-glycosylflavones.

L'activité antibactérienne appréciée par la détermination des diamètres moyens des zones d'inhibition induites par les extraits flavoniques des trois espèces sur la croissance de *S. aureus* qui s'est montré très sensible aux C-glycosylflavones, extrêmement sensible aux proanthocyanes et aux aglycones.

L'étude de l'activité antioxydante de trois classes de flavonoïdes préparés (estimée par le piégeage du radical libre DPPH) a montré que les aglycones dans leur globalité se sont montrées réductrices du DPPH bien que les aglycones d'*A. sativum* soient les plus actives atteignant une valeur de 93 % à une concentration brute. Et le plus faible pourcentage est celui révélé par les C-glycosylflavones de *A. roseum* avec une valeur de

Globalement, ce sont les aglycones qui se sont montrées les plus ont les plus réductrices du radical libre DPPH, suivies par les proanthocyanes et enfin les C-glycosylflavones.

Ces plantes valorisées pourraient constituer une source prometteuse pour la santé et l'alimentation grâce au pouvoir que leur confèrent leurs propriétés antioxydantes induites par leur richesse en polyphénols. en plus *A. roseum* et ses composés antimicrobiennes pourraient être utilisés pour désinfecter des surfaces en milieu hospitaliers et les plaies afin de lutter contre les infections nosocomiales ou comme pesticides dans le contrôle des maladies des plantes. Il serait également intéressant de compléter cette étude par des extractions polyphénoliques et des huiles essentielles à partir des bulbes et des fleurs de ces espèces et de

les analyses afin de déterminer leurs profils biochimiques et ce par HPLC et CGMS. Le genre *Allium* est très intéressant pour son intérêt alimentaire (les bulbes) et pharmaceutique (huile essentielle et composés sulfurés). Les polyphénols d'*A. sativum* pouvaient être utilisés comme une source de composés naturels avec des potentialités d'application dans les secteurs de la santé et de l'alimentaire. La propriété de réduire le radical hydroxyle est très intéressante et peut aider à prévenir les dommages oxydatifs induits par différents processus pathologiques comme les cancers et la vieillesse.

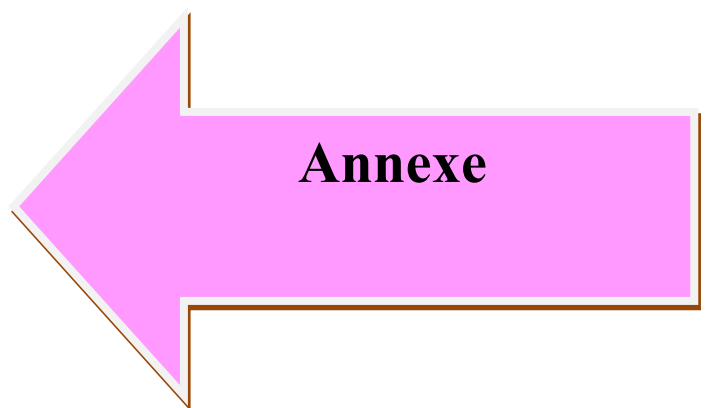


**Références
bibliographiques**

- ♣ **APG III (2009)** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*. Vol.161: 105-121.
- ♣ **BATTANDIER J-A. et TRABUT L-C. (1895)** Flore de l'Algérie. ADOLPHE JOURDAN. Algérie. p 56-58.
- ♣ **BELLAKHDAR J. (1997)** La pharmacopée marocaine traditionnelle. IBIS PRESS. France. p 764.
- ♣ **BENISTON WS. et BENISTON NT. (1984)** fleurs d'Algérie. Entreprise National du Livre. Algérie. p 138-218.
- ♣ **BOUHARB H., EL BADAOUI K., ZAIR T., EL AMRI J., CHAKIR S. et ALAOUI T. (2014)** Sélection de quelques plantes médicinales du Zerhoun (Maroc centrale) pour l'activité antibactérienne contre *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Biosciences*. Vol. 78: 6685 – 6693.
- ♣ **BROADASKY T.F., LEWIS C. et EBLE T.E., (1976)**. Bioautographic thin layer chromatophic analysis of antibiotics and their metabolites in the whole animal. I Clindamycin in the rat. *Journal of Chromatography*. Vol. 123: 33 – 44.
- ♣ **BRUNETON J. (1993)** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales 2^{ème} édition. TECHNIQUE ET DOCUMENTATION – LAVOISIER. France. p 180, 181 et 182
- ♣ **BRUNETON J. (1999)** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales 3^{ème} édition TECHNIQUE ET DOCUMENTATION – LAVOISIER. France. P 199-388.
- ♣ **FRIESEN N, FRITSCH RM, and BLATTNER FR. (2006)** Phylogeny and new intrageneric classification of *Allium* (Alliaceae) based on nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *Aliso* 22: 372–395.
- ♣ **FRITSCH R.M. and FRIESEN N. (2002)** Evolution, domestication and taxonomy, pp. 5–30. In Rabinowitch H. D. and Currah L. [eds.], *Allium* crop science: recent advances. CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire, UK.
- ♣ **HALPIN-DOHNALEK M.I., MARTH E.H. (1989)** *Staphylococcus aureus*: production of extracellular products and behavior in foods: a review. *J. Food Prot.* 4 : 267–282.
- ♣ **HEINONEN M. (2007)** Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics – a finish perspective. *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 684–691.

-
- ♣ **Institut Technique des Cultures Maraichères et Industrielles (2010)** Fiches techniques valorisées des cultures maraichères et Industrielles : La culture de l'AIL. ITCMI. Algérie. P. 2-4.
 - ♣ **IUCN Centre for Mediterranean Cooperation (2005)** A guide to medicinal plants in north Africa. IUCN Centre for Mediterranean Cooperation, Espagne. P. 22
 - ♣ **GALATI G., O'BRIEN P. (2004)** Potential toxicity of flavonoid and other dietary phenolics : significance of their chemoprotective and anticancer properties. *Free Radical Biology and Medicine*. 37 (3) : 28-303.
 - ♣ **GARCIA-HERRERA P., MORALES P., FERMANDEZ-RUIZ V., Sánchez-Mata M.C., CAMARA M., CARVALHO A.M., FERREIRA I.C.F.R., PARDO-DE-SANTAYANA M. et MOLINA M.J. (2014)** Nutrients, phytochemicals and antioxidant activity in wild populations of *Allium ampeloprasum* L., a valuable underutilized vegetable. *Trends in Food Research International*. 62 : 272–279
 - ♣ **KALLEL F., DRISSA D., CHAARIA F., BELGHITHA L., BOUAZIZ F., GHORBELA R., ELLOUZ CHAABOUNI S. (2014)** Garlic (*Allium sativum* L.) husk waste as a potential source of phenolic compounds: Influence of extracting solvents on its antimicrobial and antioxidant properties *Industrial Crops and Products*. 62 (2014) 34–41
 - ♣ **LAROUSSE (2001)** Encyclopédie des plantes médicinales : identification, préparations, soins. Édition Larousse. P. 23,53.
 - ♣ **LESUEYR D., SERRA D. DE ROCCA, BIGHELLI A., HOI T.M., BAN N.K., THAI T.H. et CASANOVA J. (2007)** Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Michelia faveolata* Merr., ex Dandy from Vietnam. *Flavour and Fragrance Journal*. Volume 22 : 317 – 321.
 - ♣ **LULLMANN H., MOHR K., Albrecht ZIEGLER A. (2001)** Atlas de poche de pharmacologie Médecine-Sciences Flammarion. France.
 - ♣ **MACHEIX J-J, FLEURIET A, JAY-ALLEMAND C. (2005)** Les composés phénoliques des végétaux. Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires Romandes. Suisse. pp 1,121-216.
 - ♣ **MAIRE R. (1958)** Flore de l'Afrique du nord : Monocotyledonae, Liliales, Liliaceae. PAUL CHVALIER. France. P. 307.
-

- ♣ **MARINOVA E., VAN DER VALK J.M.A., VALAMOTI S-M. et BRETSCHNEIDER J. (2011)** Experimental approach for tracing olive processing residues in the archaeobotanical record with preliminary examples from Tell Tweini, Syria. *Vegetation History and Archaeobotany*. 20 : 471-478
 - ♣ **MESSIAEN C-M., COHAT J., PICHON M., LEROUX J-P et BEYRIES A. (1993)** Les allium alimentaires reproduit par voie végétative. INRA. France. P. 23
 - ♣ **NENCINI C., MENCHIARI A., FRANCHI GIAN G., et MICHELI L. (2011)** In vitro antioxidant activity of aged extracts of some Italian *Allium* species. *Plant Foods for Human Nutrition*. 66 : 11–16.
 - ♣ **PONCE A.G., FRITZ R., DEL VALLE C ROUR AS.I.,(2003)** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chad. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologic*.
 - ♣ **PROCHAZKOVA D., BOUSOVA I., WILHELMOVA N. (2011)** Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*. 82 : 513–523.
 - ♣ **QUEZEL P. et SANTA S. (1962)** Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales Tome 1. EDITIONS DU CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE. France. P. 209, 211, 213
 - ♣ **SCHAUENBERG P. et PARIS F. (1977)** Guide des plantes médicinales : Analyse, description et utilisation de 400 plantes. DELACHAUX et NIESTLE, France. P.82.
 - ♣ **SEABRA R.M., ANDRADE P. B., VALENTAO P., FERNANDES E., CARVALHO F., et BASTOS M. L. (2006)** Anti-oxidant compounds extracted from several plant materials. *Biomaterials from aquatic and terrestrial organisms*. New Hampshire: Science Publishers — Enfield (NH) Jersey Plymouth.
-



Annexe 01 : Protocole de préparation de HCl a 2N

On a HCl à 37 % (flacon initial)

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

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

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

$$\begin{array}{l} 10 \text{ N} : 10.13 \text{ mol} \longrightarrow 1000 \text{ ml} \\ 1 \text{ N} : 1 \text{ mol} \longrightarrow X \text{ ml} \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} 10 \text{ N} : 10.13 \text{ mol} \\ 1 \text{ N} : 1 \text{ mol} \end{array}} \right\} X = 98.70 \text{ ml}$$

98.70 ml d'HCl 10 N ajusté jusqu'à 1000 ml d'eau distillée on aura HCl 1N

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

197.4 ml d'HCl 10 N ajusté jusqu'à 1000 ml d'eau distillée on obtient de HCl a 2N

Annexe 02 : Protocol de l'extraction des classes phénoliques.

Matériel végétales

- ♣ *A. sativum*
- ♣ *A. roseum*
- ♣ *A. ampeloprasmum*

Produits

- ♣ L'eau distillée
- ♣ HCl « 37% »
- ♣ Éther diéthylique
- ♣ 1-Butanol
- ♣ Éthanol (95°)
- ♣ Méthanol
- ♣ Papier filtres

Verreries

- ♣ Boite de pétrie
- ♣ Ampoule à décompter
- ♣ Tube à essai
- ♣ Bécher

Appareil

- ♣ Étuve
- ♣ Broyeuse électrique
- ♣ Balance de précision
- ♣ Bain marin
- ♣ Réfrigérateur
- ♣ Spectrophotomètre

Mode opératoire

- ♣ Les feuilles ont été en lanières coupées et mises à l'étuve pour le séchage dans une boîte de pétrie.
 - ♣ À l'aide d'une broyeuse électrique, nous avons réduit les feuilles en poudre, ces dernières ont été mises dans le réfrigérateur pour l'extraction.
 - ♣ Préparation d'une solution de HCl à 2N. annexe
-

- ♣ La pèse de 0.5 g et la mélanger avec 40 ml de HCL (2N).
- ♣ Le mélange est mis dans un bain marie bouillant pendant 40min avec insufflation d'air toutes les 10 min, l'oxygène permet l'oxydation des proanthocyanidines en anthocyanidines correspondantes.
- ♣ Le mélange est mit dans une ampoule à décanter et on ajoute l'Éther diéthylique. Deux phase apprissent, l'une supérieure dite épiphase et l'autre inferieure dite hypophase :
 - ♣ Épiphase éthéré : elle contient les aglycone (flavones et flavonols) et les acides phénols. Elle est récupérée après chaque extraction dans une boite de pétri et évaporée à l'air libre. Le résidu sec est repris dans 10 ml d'éthanol, puis conservé au frais avant d'être soumis à une analyse quantitative par spectrophotométrie.
 - ♣ Hypophase acide : elle contient les anthocyanes, les C-glycosides et les oses simple. Elle est récupérée et additionnée à 35 ml de 1-butanol.

L'hypophase est récupérée dans une ampoule à décanter, additionnée à 35 ml de 1-butanol. Elle forme une épiphase rougeâtre butanolique qui va être récupéré dans une boite de pétri et évaporée a l'air libre. Le résidu sec est repris dans 10 ml de méthanol, conservé par la suite avant d'être soumis à une analyse quantitative par spectrophotométrie.

Annexe 03 : tableau 01 des teneurs absolues en phénols des extraits étudiés.

Espèces	Classes phénoliques	essai	Teneur (mg/g)	Moyenne (mg/g)	Ecart type	Médiane	Variance
<i>Allium ampeloprasum</i>	proanthocyanes	essai 01	0,57	0,5454	0,066	0,522	0,00434
		essai 02	0,46				
		essai 03	0,66				
		essai 04	0,51				
		essai 05	0,52				
	C-glycosylflavones	essai 01	0,02	0,0201	0,004	0,020	0,00002
		essai 02	0,01				
		essai 03	0,03				
		essai 04	0,02				
		essai 05	0,02				
	Aglycones flavones	essai 01	0,33	0,3069	0,043	0,287	0,00187
		essai 02	0,25				
		essai 03	0,38				
		essai 04	0,28				
		essai 05	0,29				
Aglycones flavonols	essai 01	0,22	0,2195	0,051	0,205	0,00259	
	essai 02	0,16					
	essai 03	0,31					
	essai 04	0,20					
	essai 05	0,21					
<i>Allium roseum</i>	proanthocyanes	essai 01	0,34	0,4509	0,098	0,424	0,00962
		essai 02	0,38				
		essai 03	0,63				
		essai 04	0,48				
		essai 05	0,42				
	C-glycosylflavones	essai 01	0,02	0,0269	0,008	0,024	0,00006
		essai 02	0,03				
		essai 03	0,04				
		essai 04	0,02				
		essai 05	0,02				
	Aglycones flavones	essai 01	0,22	0,2880	0,057	0,282	0,00328
		essai 02	0,25				
		essai 03	0,39				
		essai 04	0,28				
		essai 05	0,30				
Aglycones flavonols	essai 01	0,14	0,1897	0,040	0,183	0,00161	
	essai 02	0,17					
	essai 03	0,26					
	essai 04	0,18					
	essai 05	0,20					
<i>Allium sativum</i>	proanthocyanes	essai 01	0,39	0,4911	0,088	0,473	0,00770
		essai 02	0,61				
		essai 03	0,47				
		essai 04	0,41				
		essai 05	0,57				
	C-glycosylflavones	essai 01	0,03	0,0479	0,020	0,040	0,00038
		essai 02	0,08				
		essai 03	0,04				
		essai 04	0,03				
		essai 05	0,07				
	Aglycones flavones	essai 01	0,34	0,4292	0,079	0,402	0,00617
		essai 02	0,54				
		essai 03	0,40				
		essai 04	0,36				
		essai 05	0,50				
Aglycones flavonols	essai 01	0,17	0,2316	0,055	0,238	0,00302	
	essai 02	0,30					
	essai 03	0,24					
	essai 04	0,17					
	essai 05	0,28					

Annexe 04: tableau 02 des diamètres moyens des zones d'inhibition (mm) obtenues avec les deux souches.

Souche bactérienne	Espèces	Classes phénoliques	essais	résulte (mm)	Moyenne (mm)	Ecart type	Médiane	Variance
<i>Staphylococcus aureus (Gram+)</i>	Allium ampeloprasum	proanthocyanes	E 01	26	23,000	2,449	23,000	6,00000
			E 02	20				
			E 03	23				
		C-glycosylflavones	E 01	16	16,667	2,494	16,000	6,22222
			E 02	20				
			E 03	14				
		Aglycones	E 01	23	18,667	3,091	17,000	9,55556
			E 02	16				
			E 03	17				
	Allium roseum	proanthocyanes	E 01	20	23,000	2,160	24,000	4,66667
			E 02	24				
			E 03	25				
		C-glycosylflavones	E 01	16	13,000	2,160	12,000	4,66667
			E 02	12				
			E 03	11				
		Aglycones	E 01	19	20,000	0,816	20,000	0,66667
			E 02	20				
			E 03	21				
	Allium sativum	proanthocyanes	E 01	20	24,333	3,091	26,000	9,55556
			E 02	27				
			E 03	26				
		C-glycosylflavones	E 01	15	15,333	0,471	15,000	0,22222
			E 02	15				
			E 03	16				
Aglycones		E 01	18	19,333	0,943	20,000	0,88889	
		E 02	20					
		E 03	20					

On n'a aucune réaction pour T- (00 mm) et pout antibiotique T⁺ on a eu 10 mm.

Annexe 05 : protocole de l'activité antioxydante

Matériel et produit utilisés

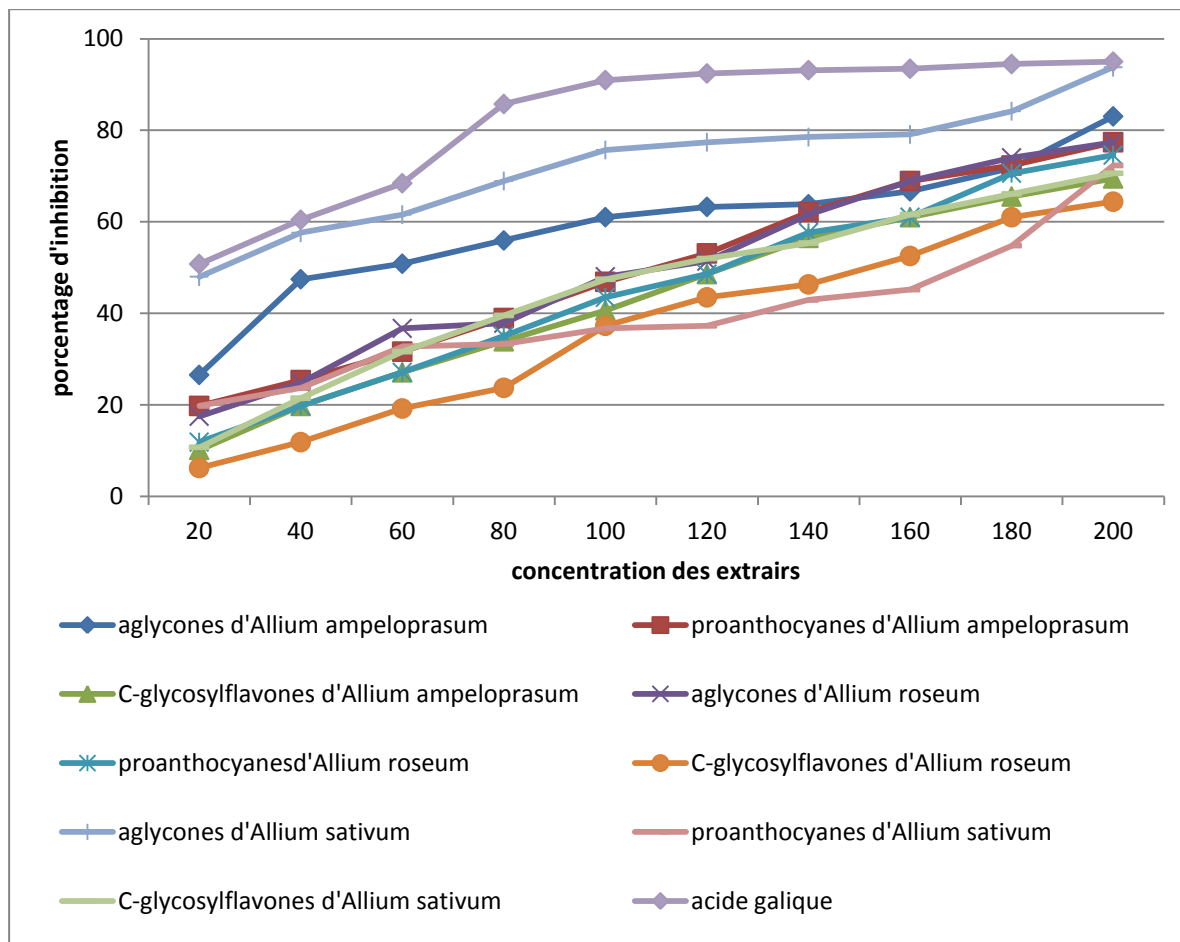
- ♣ DPPH
- ♣ Éthanol
- ♣ Balance de précision
- ♣ Agitateur
- ♣ Bande magnétique
- ♣ Spectrophotomètre

Méthode

La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 0.0024g de DPPH dans 100ml d'éthanol 1,5 ml de DPPH est ajouté à 1,5 ml d'extrait , le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30min, et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH est mesurée à 517nm.

Annexe 08

Figure 01 : Pourcentage d'inhibition de radical libre DPPH en fonction des concentrations



Annexe 09: résultats d'études statistiques**Tableau 04 :** Test Univariés de Significativité pour quantité

Par métrisation sigma-restreinte

Décomposition efficace de l'hypothèse

effet	SC	Degr. De liberté	MC	F	P
Ord. origine	4,393198	1	4,393198	1036,849	0,000000
espèce	0,037433	2	0,018717	4,417	0,017340
Classes flavoniques	1,741220	3	0,580407	136,983	0,000000
Espèce*classes flavoniques	0,050549	6	0,008425	1,988	0,085790
Erreur	0,203379	48	0,004237		

Tableau 05 : Test de Newman-keuls; variable quantité, groupes homogènes, $\alpha = 0,05$

Erreur : MC inter = 0,00424, dl = 48,00

Cellule n	Classes flavoniques	Quantité moyen	1	2	3	4
2	C-glycosylflavones	0,031621	****			
4	aglycones flavonols	0,213599		****		
3	aglycones flavones	0,341345			****	
1	proanthocyanes,	0,495803				****

Tableau 06 : Test de Newman-keuls; variable quantité, groupes homogènes, $\alpha = 0,05$

Erreur : MC inter = 0,00424, dl = 48,00

Cellule n	Classes flavoniques	Quantité moyen	1	2
2	A. roseum	0,23889	****	
1	A. ampeloprasum	0,272949	****	****
3	A. sativum	0,299936		****

Tableau 07 : Test de Newman-keuls; variable diamètre, groupes homogènes, $\alpha = 0,05$

Erreur : MC inter = 3,8148, dl = 36,00

Cellule n	Classes flavoniques	Diamètre moyen	1	2	3
1	C-glycosylflavones	15,00000	****		
2	aglycones flavones	19,33333		****	
3	proanthocyanes,	23,44444			****

Résumé

Au cours de cette étude, quarts classe de flavonoïdes contenus dans trois espèces d'*Allium* ont été extraits par la technique l'hydrolyse acide à chaud de la poudre des feuilles, et quantifiés par colorimétrie. Les valeurs les plus importantes révélées par les proanthocyanes, ensuite les aglycones flavones après les aglycones flavones et en fin les C-glycosylflavones avec une valeur faible.

L'activité antibactérienne est mesurée par diamètres moyens des zones d'inhibition induites par les extraits flavoniques de nos trois espèces. *S. aureus* est très sensible aux C-glycosylflavones, extrêmement sensible aux proanthocyanes et aux aglycones.

L'activité antioxydante des extraits préparés a été mesurée par le piégeage de radical libre DPPH et comparait au résultat de l'acide gallique. Avec plus de 90 % de réduction du DPPH, les aglycones d'*A. sativum* semblent être ceux de qui ont inhibé le plus le radical libre, L'effet inhibiteur le plus faible a été enregistré avec les C-glycosylflavones d'*A. roseum* (64.40%) et C-glycosylflavones d'*A. ampeloprasum* (69.49 %).

Abstracts

In the course of this study, fourths class of flavonoids in three species of *Allium* were extracted using acid hydrolysis the leaf powder hot, and quantified by Colorimetry. The most important values revealed by the proanthocyanes, then the aglycones flavones after aglycones flavones and end C-glycosylflavones with a low value.

The antibacterial activity is measured by average diameters of the zones of inhibition induced by extracts flavonoids of our three species. *S. aureus* is sensitive C-glycosylflavones, extremely sensitive to the proanthocyanes and the aglycone.

Antioxidant activity of three extracts prepared was measured by the DPPH free radical scavenging and compared to the result of Gallic acid. With more than 90% of the DPPH, the aglycones of *A. sativum* reduction seem to be those which inhibited more than the free radical, the lowest inhibitory effect was recorded with the C-glycosylflavones from *A. roseum* (64.40%) and C-glycosylflavones from *A. ampeloprasum* (69.49%).
