

**RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université 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**

## **Thème**

**Etude morphométrique, extraction de trois classes de flavonoïdes et essai d'élaboration des caryotypes de deux espèces de scilles (*Prospero fallax* et *Hyacinthoides lingulata*)**

**Présenté par :**

**M<sup>r</sup> : SADOUDI Mahdi**

**M<sup>elle</sup> : OULDKACI Nabila**

**Devant le jury :**

**M<sup>me</sup>: SAHMOUNE – SIDI MANSOUR F.**

**MACCA (UMMTO) présidente**

**M<sup>me</sup> : TALEB-TOUDERT K.**

**Docteur (UMMTO) promotrice**

**M<sup>r</sup> : BAIK N.**

**Doctorant (USTHB) co-promoteur**

**M<sup>r</sup> : HARGAZ H.**

**MACCA (UMMTO) examinateur**

**M<sup>me</sup>: MEZAOUR N.**

**MACCA (UMMTO) examinatrice**

*Promotion 2015/2016*



## **Remerciements**

*Avant toutes choses, nous remercions ALLAH ; pour l'aide et la force qu'il nous a donnée, sans lesquels ce mémoire n'aurait pas pu voir le jour.*

*Nous tenons à exprimer nos profonds remerciements et notre vive reconnaissance à notre promotrice, le docteur Taleb-Toudert Karima, qui a su, nous conseiller et nous orienter tout au long de la réalisation de ce travail.*

*Nous remercions vivement les membres du jury:*

*Madame Sahmoune – Sidi mansour F. Maître Assistante chargée de cours à l'UMMTO d'avoir accepté de présider le jury.*

*Monsieur Hargas H. Maître Assistant chargé de cours à l'UMMTO et Madame Mezaour N. Maître Assistant chargé de cours à l'UMMTO pour l'intérêt qu'ils ont accordé à notre travail en acceptant de l'examiner.*

*Nos remerciements les plus sincères s'adressent au professeur YAKOUB S. responsable du master génétique et amélioration des plantes et du laboratoire CIV, qui nous a accueilli pendant la partie expérimentale.*

*Nos remerciements s'adressent à Monsieur Baik N. Doctorant à l'USTHB pour nous avoir ramené des échantillons, sa précieuse aide, et sa contribution à la réalisation de ce travail.*

*Monsieur Ait Sidhoum et Madame Alkama pour avoir eu la gentillesse de nous consacrer leurs temps et leur précieuse aide en statistiques. Nous remercions vivement Mademoiselle Ourari F. pour l'aide et les conseils qu'elle nous a prodigués à distance concernant l'essai de détermination du caryotype des espèces étudiées. Nos remerciements s'adressent aussi à nos camarades, Mademoiselle Sedki W. et Mademoiselle Fedoul Dj. pour leur précieuse aide et conseils. Nous remercions également le Dr. Kitous pour son aide et de nous avoir bien orientés. Nous remercions profondément le Dr. Hennab pour sa gentillesse et son accueil dans son service au CHU de Tizi-Ouzou. Nous remercions vivement tous les enseignants que nous avons eu tout au long de notre cursus, sans lesquels nous n'en serions pas là aujourd'hui. Nous remercions tous nos camarades de*

*promotion, et particulièrement le groupe avec lequel nous avons partagé de bons et de moins bons moments, Nadir, Sarah, Malek, Saliha, Moussa, Cici, Radia, Salamou, Karim, Sissi... pour leur bonne humeur et leur joie de vivre.*

*A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail, à toutes les mains qui nous ont été tendues, nous disons **Merci**.*

# Dédicaces

Je dédie ce travail à ceux qui, sans eux rien  
n'aurait pu être

Ma très chère famille.

A ma grand-mère Titem que j'aime plus que  
tout.

A tous mes amis qui partagent mon quotidien,  
Karim, Salamou et tous les autres.

A tous les membres de Numidia, musicalement  
votre.

## *Dédicaces*

***Je dédie ce travail à***

***Mes chers parents***

*Je ne trouverai jamais les mots pour vous exprimer mon profond attachement et ma reconnaissance pour l'amour et la tendresse dont vous avez fait preuve à mon égard mais surtout pour votre présence à mes côtés dans les moments les plus difficiles. Je ne vous remercierai jamais assez pour vos encouragements à chaque instant de ma vie et votre soutien indéfectible à tout moment tout le long de mes études.*

***Mes chers(e) frères et sœurs pour leur disponibilité, leur soutien moral et leurs encouragements incessants.***

***Mes neveux et nièces, lumière de ma vie***

***Ma chère promotrice madame Taleb, pour votre présence, disponibilité et votre soutien tout le long de ce travail.***

***Mes Amis et en particulier mes copines, Sarah, Radia, et surtout ma petite Sissi et à tous ceux qui ont donné sans attendre rien en retour.***

**Figure 1 :** Distribution géographique des scilles à travers le monde. p.7

**Figure 2 :** *Hyacinthoides lingulata*. p.8

**Figure 3 :** *Prospero fallax*. p.10

**Figure 4 :** Voies de Biosynthèse des composés phénolique. p.13

**Figure 5:** Squelette flavonoïque (C-6C-3C-6). p.15

**Figure 6:** Différentes classes de polyphénols. p.16

**Figure 7 :** Biosynthèse des flavanoïdes. p.17

**Figure 8:** Représentation des différentes phases de prolifération du cancer et des potentiels lieux d'action des polyphénols végétaux. p.20

**Figure 9:** Cliché de métaphase mitotique and idiogrammes correspondant aux espèces *Prospero*. p.22

**Figure 10 :** Cliché de métaphase mitotique and idiogrammes correspondant aux genres *Barnardia* et *Hyacinthoides*. p.22

**Figure 11 :** Structure d'un chromosome métaphasique. p.24

**Figure 12:** Site de prélèvement des échantillons de *H.lingulata* et *P.fallax*. p.25

**Figure 13 :** Feuilles de *H.lingulata*, *P.fallax* mises en boîte de pétrie avant séchage et avant broyage. p.26

**Figure 14:** Bulbes de *H.lingulata*, *P.fallax* mis en boîte de pétrie avant séchage et avant broyage. p.27

**Figure 15 :** Caractères morphologiques quantitatifs mesurés chez les deux espèces *Prospero fallax* et *Hyacinthoides lingulata*. p.28

**Figure 16:** Etapes de l'extraction par hydrolyse acide. p.30

**Figure 17:** Ampoule à décanter contenant une épiphase étherée et une hypophase acide. p.31

**Figure 18 :** Spectrophotomètre. p.33

**Figure 19:** Racines de *Prospero fallax* colorées au carmin acétique. p.35

**Figure 20:** Racines de *Prospero fallax* montées sur lames. p.36

**Figure 21:** Moyennes des caractères morphologies mesurées sur *Prospero fallax* et *Hyacinthoides lingulata*. p.37

**Figure 22:** Moyennes des teneurs absolues des trois classes des flavonoïdes dans les feuilles et bulbes de *prospero fallax*. p.38

**Figure 23:** Moyennes des teneurs absolues des trois classes des flavonoïdes dans les feuilles et bulbes de *hyacinthoides lingulata*. p.39

**Figure 24:** Teneurs absolues moyennes des 3 classes des flavonoïdes dans les feuilles de *prospero fallax* et *hyacinthoides ligulata*. p.41

**Figure 25:** Teneurs absolues moyennes des 3 classes des flavonoïdes dans les bulbes de *prospero fallax* et *hyacinthoides lingulata*. p.42

**Figure 26:** Plaque métaphasique de *Prospero fallax*. p.43

**Figure 27 :** Plaque métaphasique de *Prospero fallax*. p.44

**Figure 28 :** Cliché d'une plaque métaphasique de *Prospero autumnal* avec  $2n = 28$ . p.44

**Tableau 1** : Position des scilles à travers les différents systèmes de classification. P.6

**Tableau 2**: Scilles de la flore d'Afrique du nord, nouvelles dénominations, aires de répartition et endémisme. P.7

**Tableau 3**: Exemples de composés phénoliques et leurs origines. P.18

## Introduction

Le continent africain est doté d'une biodiversité parmi les plus riches dans le monde, avec un nombre très élevé de plantes utilisées comme herbes, comme aliments naturels ou dans des buts thérapeutiques.

Malgré la nature hétérogène d'une biodiversité immense du continent africain en général et de l'Algérie en particulier, beaucoup d'espèces restent mal répertoriées ou encore mal connues à ce jour. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à l'étude de deux espèces de scilles, à savoir *Prospero fallax* et *Hyacinthoides lingulata*.

Les scilles sont des petites bulbeuses de la famille des Hyacinthaceae (ex. Liliaceae) avec de petites fleurs étoilées bleues à violettes. Elles sont connues pour leur usage ornemental et de décoration dans tout type d'environnement. La diversité systématique et cytogénétique de ce groupe de plantes et leur endémisme particulier, en font des modèles d'évolution et de spéciation.

En ce qui concerne l'Afrique du nord, et l'Algérie en particulier, les connaissances sur les scilles et le genre *Prospero* sont mal connues en dépit de ressources botaniques et de flores anciennes considérables (Maire, 1958). Par ailleurs, les référentiels et bases de données actuels concernant la mise à jour nomenclatrice de la Flore Nord-africaine (*African Flowering Plants Database\**), sont insuffisants en raison de confusions synonymiques et d'ambiguïtés des critères diagnostiques des anciennes flores, mais surtout en raison de la complexité biologique liée au polymorphisme des populations et à la polyploidie qui n'est pas prise en compte dans les flores. (Hamouche, 2014).

Les approches morphologiques et cytogénétiques, s'avèrent pertinentes pour une connaissance parfaite des unités biologiques, c'est-à-dire la délimitation des espèces, leurs relations de parenté, leur évolution. Les données constituent sans doute des indicateurs pour l'évaluation et le suivi de la biodiversité.

Du point de vue biochimique et de la pharmacopée, les scilles sont connues pour leur production abondante de triterpènes dont des hétérosides (scillirosides) à activités cardiotonique et raticide ; certaines espèces renferment aussi des flavonols comme le kaempferol et le quercetol, réputés parmi les antioxydants les plus efficaces des flavonoïdes (Watson et Dalwitz, 2002 ; Krenn *et al.*, 2001, 2004).

L'objectif de ce travail est donc d'appréhender la diversité des scilles automnales d'Algérie principalement par la comparaison de *Prospero fallax* à *Hyacinthoides lingulata*. Il reposera sur un échantillonnage d'individus effectué dans la région de Kabylie, à savoir Tizi Rached, et s'articulera autour de trois approches complémentaires : morphologiques, caryologiques et biochimique.

Le manuscrit sera subdivisé en trois chapitres :

Le premier chapitre sera consacré à une synthèse bibliographique relative aux scilles ainsi qu'aux flavonoïdes.

Le deuxième chapitre abordera le matériel et méthodes utilisées.

Le troisième chapitre sera consacrée aux résultats et discussion, et enfin une conclusion et perspectives d'étude.

## I Aperçu bibliographique sur les scilles :

### 1.1 Description botanique des Scilles automnales :

Quezel et Santa (1963) ont décrit les scilles comme étant des plantes bulbeuses à bulbe tunique. Les bractées florales peuvent être présentes ou absentes, non éperonnées à la base. La tige florifère est aphyllé. Les fleurs se regroupent en grappes, petites, de coloration variable. Les tépales sont libres ou brièvement soudés à la base. L'ovaire est à 3 loges, généralement bleu. Le fruit est une capsule subglobuleuse, membraneuse et loculicide. Les graines sont non aplaties, obovées ou subglobuleuses.

Le genre *Scilla* regroupe plusieurs espèces, dont :

- *Scilla hispanica* Mill. End. Alg. Tun.
- *Scilla aristidis* Coss. Tell. End. N.A
- *Scilla obtusifolia* Poiret.
- *Scilla numidica* Poiret.
- *Scilla peruviana* L.
- *Scilla lingulata* Poiret.
- *Scilla autumnalis* L. Tell qui se divise en deux sous-espèces :
  - 1- Ssp. eu-autumnalis M.
  - 2- Ssp. fallax (Steinh.) Batt.

### 1.2 Historique de la classification botanique des Scilles :

Les scilles, à l'instar de la majorité des monocotylédones pétaloïdes, appartenaient à la grande famille des Liliaceae, ordre des Liliales (Cronquist, 1981). Ces dernières décennies, les données de phylogénie moléculaire ont conduit, à l'intérieur de cette famille polyphylétique, à d'importants changements taxonomiques et dans les relations phylétiques et évolutives. Désormais, plusieurs familles ont été créées et réparties dans deux principaux ordres, les Liliales et les Asparagales (Cronquist 1981 ; Pfosser et Speta, 1999 ; APG I, 1998 ; APG II, 2003 ; APG III, 2009).

Si dans le système APG I (1998), la famille des Liliaceae incluait encore les Hyacinthaceae et autres nouvelles petites familles, dans les systèmes APG II (2003) et APG III (2009), ces familles ont été réunies dans d'autres groupes plus importants de l'ordre des Asparagales. C'est le cas notamment de la famille des scilles.

La nature polyphylétique du genre *Scilla* L., l'un des plus importants de la famille des Hyacinthaceae, a conduit à une profonde révision, soutenue par les données de chimio-taxonomie, de cytogénétique et notamment de phylogénie moléculaire.

Les espèces qui appartenaient à l'ancien genre *Scilla*, ont été ainsi réparties entre plusieurs genres différents (Speta, 1982-2000) ; trois d'entre eux concernant les scilles automnales de la flore nord-africaine, à savoir : *Prospero*, *Hyacinthoides* et *Barnardia*.

*Scilla fallax* (Steinh.) Batt. , qui était jusque-là une sous-espèce de *Scilla autumnalis* M. dans la classification de Cronquist (1981), et alors assignée au genre *Prospero*.

**1.2.1 Classification des scilles selon Quézel et Santa (1962-1963) :** cette classification est basée sur les caractères botaniques.

Classe : Monocotylédones

Ordre : Liliales

Famille : Liliaceae

Genre : *Scilla*

**1.2.2 Classification des scilles selon Cronquist (1981) :** C'est la classification la plus usuelle et la plus admise des botanistes, jusqu'en 1981. C'est une classification basée sur les caractères morphologiques, anatomiques et chimiques.

Cronquist (1981) a revu la position taxonomique des scilles, en subdivisant le genre *Scilla* décrit par Quézel et Santa (1962-1963), en deux nouveaux genres. Il a classé les scilles alors comme suit :

Règne : Plantae

Sous règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Liliopsida

Sous classe : Liliidae

Ordre : Liliales

Famille : Liliaceae

Genre 1 : Scilla

Genre 2 : Hyacinthoïdes

**1.2.3 Classification des scilles selon Pfosser et Speta (1999) :** classification phylogénique basée sur les séquences d'ADN nucléaire, ou les scilles sont classées dans l'ordre des Asparagales.

Classe : Liliopsida

Ordre : Asparagales

Famille : Hyacinthaceae

Genre 1 : Scilla

Genre 2 : Hyacinthoïdes

Genre 3 : Barnardia

Le tableau ci-dessous, emprunté à Hamouche (2014) résume l'évolution de la classification des scilles de 1887 à 2009.

**Tableau 1** : Position des scilles à travers les différents systèmes de classification (HAMOUCHE 2014).

Rang	Engler 1887	Takhtajan 1980	Cronquist 1981	Dahlgreen 1985	Thorne 1992	APG I 1998	APG III 2009	Chase et al., 2009
Super-classe						Monocolpées (Monocots)	Monocolpées (Monocots)	Monocolpées (Monocots)
Classe	Monocotyledonae	Liliopsida	Liliopsida	Magnoliopsida	Magnoliopsida	Liliopsida	Liliopsida	Liliopsida
Sous-classe		Liliidae	Liliidae	Liliidae	Liliidae			
Super-ordre		Lilianae		Lilianae	Lilianae			
Ordre	Liliiflorae	Amaryllidales	Liliales	Asparagales	Asparagales	Asparagales	Asparagales	Asparagales
Sous-ordre	Liliineae							
Famille	Liliaceae	Liliaceae	Hyacinthaceae	Hyacinthaceae	Hyacinthaceae	Hyacinthaceae	Asparagaceae	Asparagaceae
Sous-famille						Hyacinthoideae	Hyacinthoideae	Scilloideae
Tribu						Hyacintheae	Hyacintheae	Hyacintheae

### 1.3 Répartition géographique des scilles :

En 1962, Quézel et Santa ont proposé un ouvrage synthétique, la *Nouvelle Flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales*.

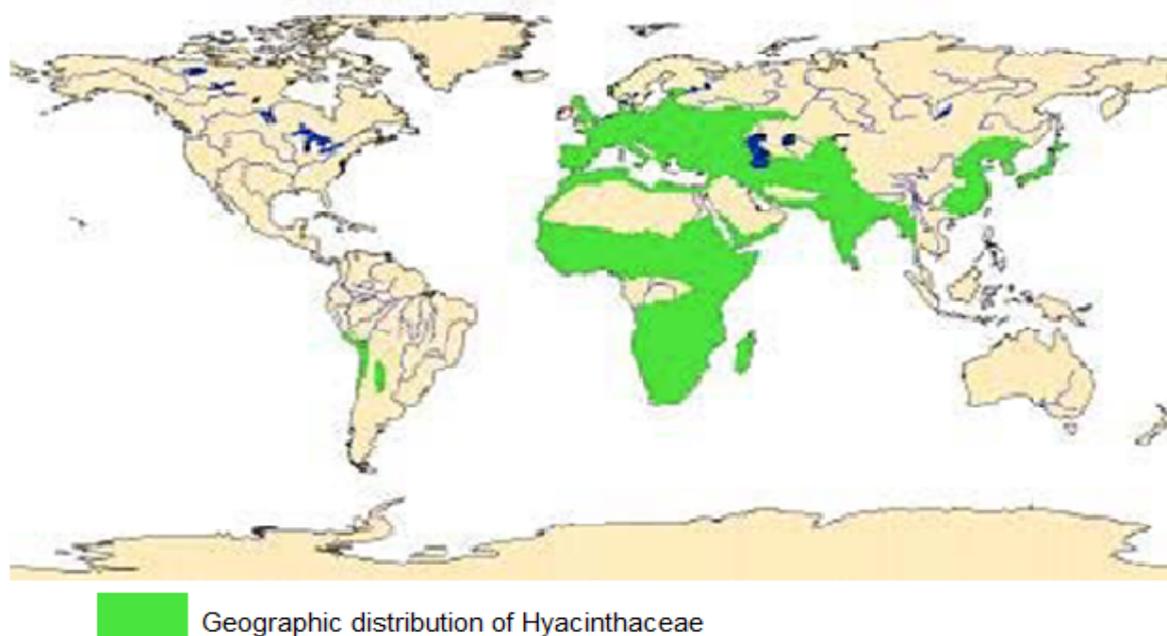
Sur les 14 espèces de *Scilla* L. reconnues en Afrique du Nord, sept dont trois endémiques, se rencontrent en Algérie. Ces espèces sont très répandues depuis le Tell jusqu'aux Hauts-Plateaux et le versant nord de l'Atlas saharien. Elles prospèrent dans des biotopes ouverts et plus ou moins frais comme les prairies, les pâturages et les clairières de forêts. Tableau 2.

**Tableau 2:** les Scilles de la flore d'Afrique du nord, nouvelles dénominations, aires de répartition et endémisme (HAMOUCHE 2014).

Espèces citées dans les Flores d'Afrique du Nord (*)	Statut dans les référentiels actuels (**)	Aire de répartition / Endémisme			
		Maroc	Algérie	Tunisie	Lybie
<i>Scilla lingulata</i> Poir.	<i>Hyacinthoides lingulata</i> (Poir.) Rothm.	+	+	+	+
<i>Scilla aristidis</i> Coss.	<i>Hyacinthoides aristidis</i> (Coss.) Rothm.		+	+	
<i>Scilla hispanica</i> Mill.	<i>Hyacinthoides hispanica</i> (Mill.) Rothm.	+	+		
<i>Scilla mauritanica</i> Schousb.	<i>Hyacinthoides mauritanica</i> (Schousb) Speta	+			
<i>Scilla numidica</i> Poir.	<i>Barnardia numidica</i> (Poiret) Speta		+	+	
<i>Scilla autumnalis</i> L.	<i>Prospero autumnale</i> (L.) Speta	+	+	+	+
<i>Scilla autumnalis</i> subsp. <i>fallax</i> Steinh.	<i>Prospero fallax</i> (Steinh.) Speta	+	+	+	+
<i>Scilla obtusifolia</i> Poir.	<i>Prospero obtusifolium</i> (Poiret) Speta	+	+	+	+
<i>Scilla peruviana</i> L.	<i>Oncostema peruviana</i> (L.) Speta	+	+	+	+
<i>Scilla villosa</i> Desf.	<i>Oncostema villosa</i> (Desf.) Raf.			+	+
<i>Scilla hyacinthoides</i> L.	<i>Nectaroscilla Hyacinthoides</i> L. (Parl.)	+	+	+	+
<i>Scilla latifolia</i> Willd.	<i>Autonoë latifolia</i> (Willd.) Speta	+			
<i>Scilla monophyllos</i> Link.	<i>Tractema tingitana</i> (Schousb.) Speta	+			
<i>Scilla verna</i> Huds.	<i>Scilla verna</i> Huds	Euro-méditerranéenne			

(\*) - Flores d'Afrique du Nord : Battandier & Trabut (1884-1902), Maire (1958) et Quézel & Santa (1962)

(\*\*) - Africa Flowering Plants Database: <http://www.ville-ge.ch/musinfo/bd/cjb/africa/recherche.php>



**Figure 1 :** Distribution géographique des scilles à travers le monde (Pfoser et Speta, 1999)

#### 1.4 Description botanique de *Scilla lingulata* Poiret. :

Les bractées florales sont absentes ou rudimentaires. Les feuilles n'apparaissent généralement pas toujours en même temps que les fleurs. L'ovaire est à loges Biovulées. Les anthères sont pourpre-noir. La bractée florale est nettement marquée. La plante feuillée peut fleurir par fois, et celle à tige florifère est la seule à se développer. Les feuilles sont linéaires ou filiformes de 1 à 2 cm de large pour 10 à 12 cm de long. Elles ne sont pas hispidules. La plante mesure 5 à 30 cm de long. La tige florifère est droite ou déjetée sur le côté. Les fleurs sont de couleurs variables (bleues, lilas, roses ou blanches). Les graines sont noir mat.

Elles poussent dans les forêts, pâturages, très fréquentes dans le sub-atlas Méditerranéen (Becal el Far).



Figure 2 : *Hyacinthoides lingulata*

**1.4.1 Classification botanique de *Hyacinthoides ligulata* selon Cronquist (1981):**

Règne : Plantae

Sous règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Liliopsida

Sous classe : Liliidae

Ordre : Asparagales

Famille : Hyacinthaceae

Genre : Hyacinthoides

Espèce : *Hyacinthoides ligulata*

**1.4.2 Classification botanique de *Hyacinthoides ligulata* selon Angiosperm phylogeny group (APG3, 2009):**

Règne : Plantae

Sous règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Liliopsida

Sous classe : Liliidae

Ordre : Asparagales

Famille : Asparagaceae

Genre : *Hyacinthoides*

Espèce : *Hyacinthoides ligulata*

### 1.5 Description botanique de *Prospero fallax* (Steinh.) Batt. :

*Prospero fallax* présente des feuilles oblongues-linéaires, de 5-25 mm de large sur 20-30 cm de long,  $\pm$  obtuses au sommet et mucronulées, à marges papilleuses. Cette sous-espèce est caractérisée par 2 à 3 tiges florifères, déjetées sur le côté, arquées à la base, puis redressées.

Les inflorescences sont en grappes de 20-60 fleurs. Les fleurs sont de couleurs purpurines ou blanches. Les graines noir luisant. Cette sous-espèce est très commune dans les forêts, broussailles, pâturages, tell, hauts plateaux, la Corse, la Sardaigne, Sicile. (Quézel et Santa 1962).



**Figure 3 :** *Prospero fallax*

**1.5.1 Classification de *Prospero fallax* selon Cronquist (1981) :**

Règne : Plantae

Sous règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Liliopsida

Sous classe : Liliidae

Ordre : Liliales

Famille : Liliaceae

Genre : *Scilla*

Espèce : *Scilla autumnalis*

Sous-espèce : *Scilla fallax*

**1.5.2 Classification botanique de *Prospero fallax* selon Angiosperm phylogeny group (APG3, 2009):**

Règne : Plantae

Sous règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Liliopsida

Sous classe : Liliidae

Ordre : Asparagales

Famille : Asparagaceae

Genre : *Prospero*

Espèce : *Prospero fallax*

## **II les composés phénoliques :**

### **2.1 Définition des polyphénols :**

Avec environ 9000 structures naturelles élucidées à ce jour, les polyphénols constituent une famille importante de métabolites secondaires de faible poids moléculaire du règne végétal (Akowah et al, 2004), qui correspondent à une très large gamme de structures chimiques et sont un bon témoin de l'extraordinaire capacité de biosynthèse des plantes. Ce sont des corps dont la molécule contient plusieurs fonctions phénols (Ferguson L,2000), ces corps jouent un rôle fondamental car sont des éléments importants de qualités sensorielles (couleur et caractère organoleptique.) et nutritionnelles des végétaux que consomme l'homme et leur intervention dans la santé et maintenant reconnue dans des domaines variés, anti-cancérigène ,antioxydant , la lutte contre le vieillissement des cellules (Sami-Manchado et Cheynier,2006), anti oestrogenique et anti inflammatoire, certains d'eux sont dits non nutritionnels car ils ne jouent aucun rôle dans la plante.

Les principales voies de biosynthèse des polyphénols sont résumées dans la figure 2.

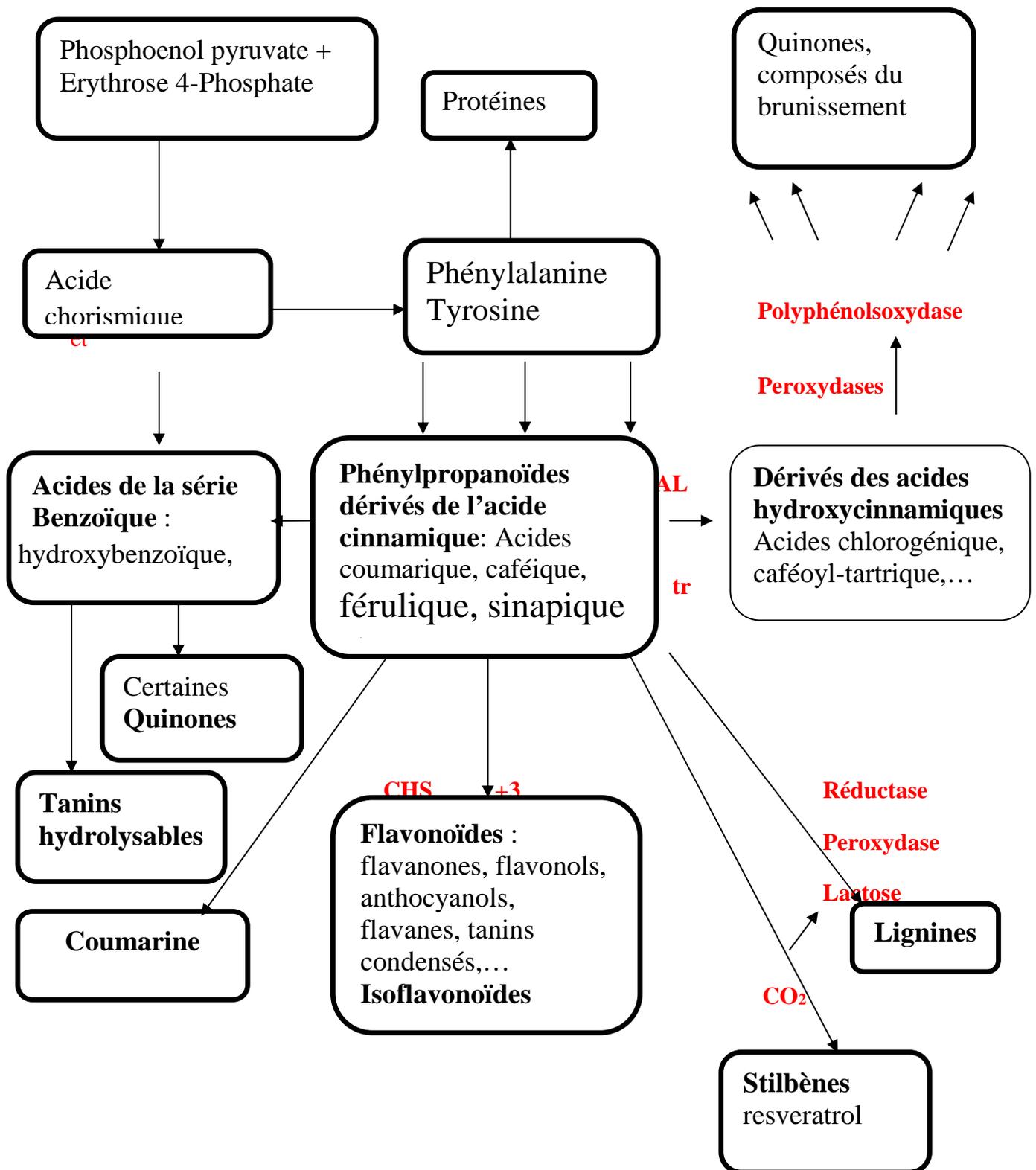


Figure 4 : Voies de Biosynthèse des composés phénoliques (Macheix, 2005)

## **2.2 Structure et classification des polyphénols :**

Cheynier (2005) a classé les polyphénols en deux classes majeurs : les flavonoïdes et les non-flavonoïdes.

### **2.2.1 Les non-flavonoïdes :**

Cette classe englobe des molécules simples tels que les acides phénoliques (dérivés hydroxybenzoïques, hydroxycinnamiques et coumarines), les stilbénes, et des molécules complexes comprenant les oligomères de stilbénes, tanins et lignines.

### **2.2.2 Les flavonoïdes (C6-C3-C6) :**

Les flavonoïdes présentent la plus grande classe de polyphénols, ils relèvent du métabolisme secondaire et sont très répandus dans le règne végétal. On estime que 2% de l'ensemble du carbone photo-synthétisé par les plantes et transformé en flavonoïdes (Alothmane et al, 2009).

Ils sont présents dans les feuilles, les fleurs, le pollen, et les fruits, leur concentration augmente avec l'exposition au soleil et constituent de ce fait un écran protecteur contre la photo et la thermodégradation (protège la plante des agressions du rayonnement UV) (Sami-manchado et Cheynier, 2006). Ils participent aussi à la coloration des fleurs et des fruits et existent le plus souvent à l'état naturel sous forme d'hétérosides.

Les flavonoïdes sont des molécules polyphénoliques avec un squelette diphenylpropane (C6-C3-C6) (Alothmane et al, 2009), fait de 15 atomes de carbone, avec une grande diversité structurale, en effet, on en dénombre 5000 composés différents et présentant des propriétés de solubilités différentes influençant leurs extraction (Alothmane et al, 2009).

Plusieurs études ont souligné que les flavonoïdes de différentes sources botaniques agissent comme antioxydants puissants encore plus que la vitamine C (Alothmane et al. 2009), due principalement à la configuration catéchol du noyau B.

Cette activité s'exerce surtout dans les milieux émulsionnés car ils sont peu solubles dans les phases lipidiques et protègent efficacement les lipoprotéines ou liposomes (Sami-manchado et Cheynier, 2006). Les flavonoïdes agissent comme antioxydants primaires et stabilisent les radicaux peroxydes, mais peuvent aussi désactiver l'ion super-oxyde, le radical  $\text{OH}^*$  ou l'oxygène singulet, inhiber la lipoxygénase ou encore chélater les métaux (surtout les flavonoïdes) (Sami-manchado et Cheynier, 2006)

- **Les anthocyanes :**

Ce sont des pigments végétaux hydrosolubles, de couleur rouge en milieu acide, violette ou bleu en milieu alcalin (Schauenberg et Paris, 1974 ; Adrian et al, 1995).

Les anthocyanes sont très répandus dans le règne végétal sous forme d'hétérosides (anthocyanosides) ou d'anthocyanidols (Guignard, 2000 ; Ghistem et al, 2001). Ils se trouvent dans de nombreuses fleurs, fruits mûrs et parfois des feuilles, auxquels elles confèrent leur couleur (Longo et al, 2007).

Par ailleurs, les anthocyanes maintiennent en bon état les vaisseaux sanguins (Iserin, 2001) et sont utilisés comme colorants alimentaires naturels. Ce sont aussi des antioxydants et des agents anti-inflammatoires (Longo et al, 2007).

- **Les aglycones flavoniques :**

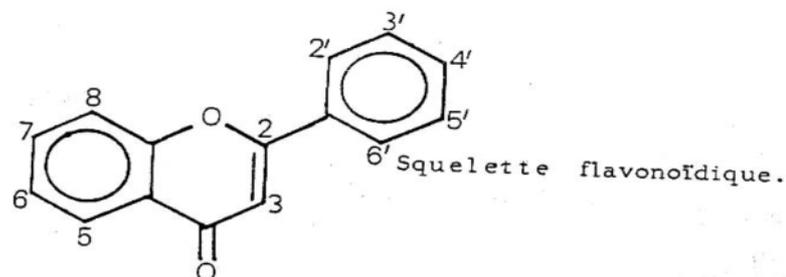
Un aglycone, ou une génine est un composé organique constitué de la partie non-glucidique d'un hétéroside ; il s'agit donc du groupe auquel un sucre (ose) est lié dans l'hétéroside.

L'aglycone (partie non-sucrée ou génine) peut être de nature chimique très variée : il peut s'agir d'un alcool, d'un phénol, d'une substance à fonction aminée, ou à fonction thiol, spécifique (thérapeutiques ou toxiques par exemple).

- **Les C-glycosides :**

Ce sont des composés C-glycosyflavonoïdes qui ne sont pas rares, on en connaît plus de 350.

Ils sont constitués d'un sucre et d'une génine, et qui sont liés par l'établissement d'une liaison entre le carbone anomérique du sucre (qui est souvent le glucose, mais peut-être aussi le galactose ou le pentose) et le carbone C-6 ou C-8 de la génine qu'elle est souvent flavonique, mais peut-être d'autre type : flavonol, chalcone,... etc. (Brunton 1999).

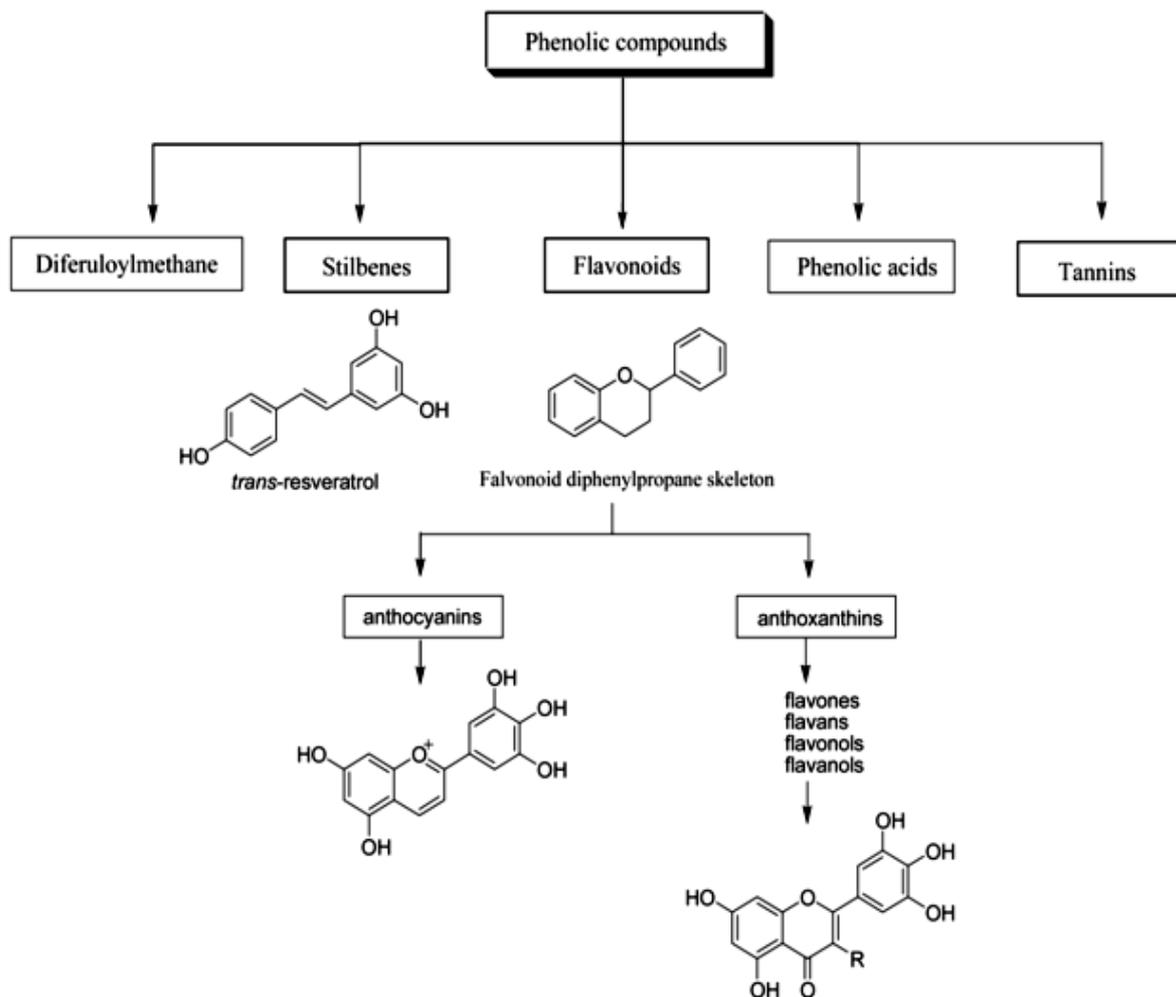


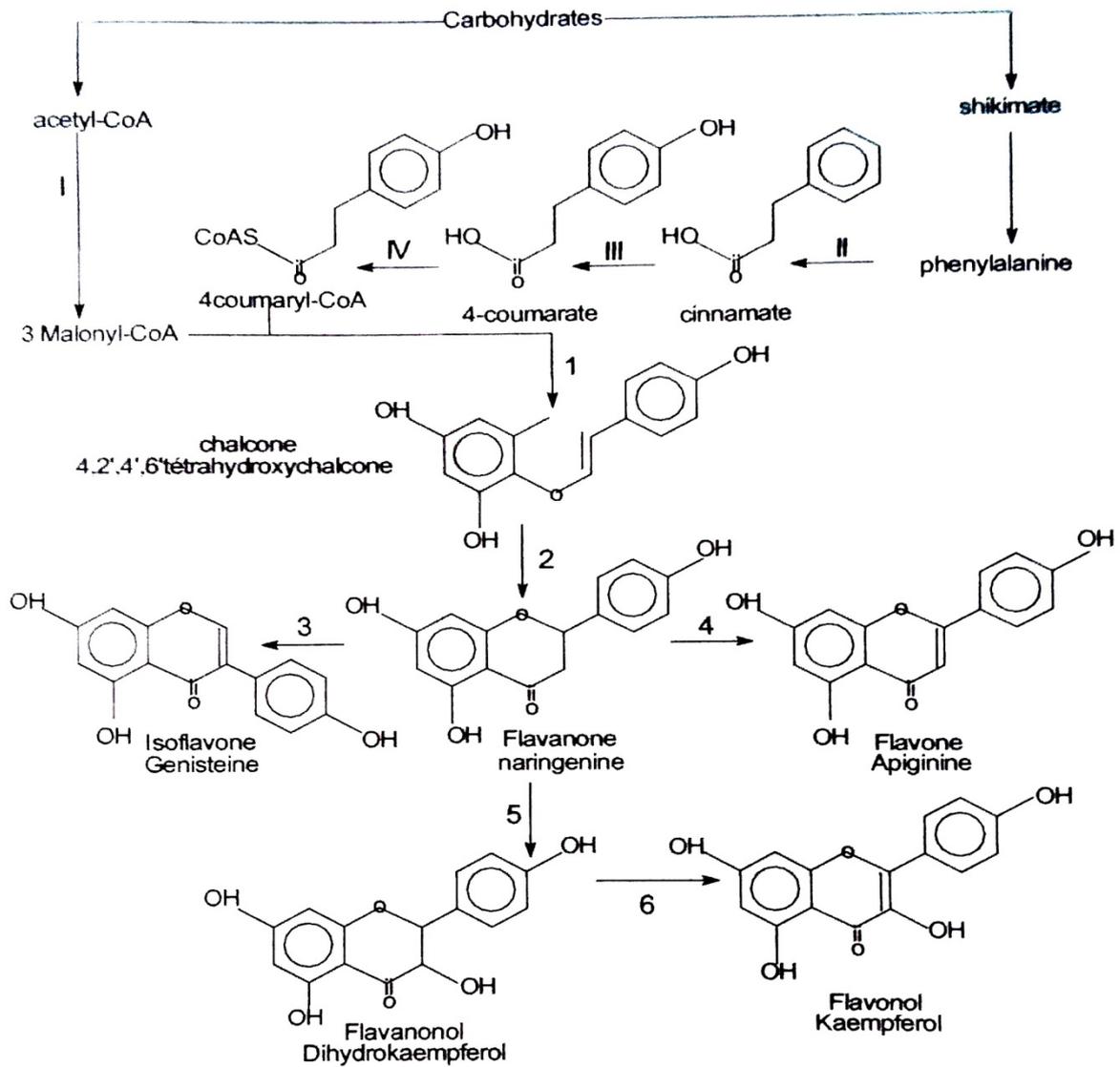
**Figure 5:** Squelette flavonoïdique (C-6C-3C-6) (Brunton, 1999).

Cette structure offre généralement deux types de substitution :

- O-substitution :**
- hydroxylation (-OH)
  - méthylation (-O-CH<sub>3</sub>)
  - O-glycosylation (-O-Ose)
- C- substitution :**
- C-méthylation (-C-CH<sub>3</sub>-)
  - C-glycosylation (-C-Ose)

D'après le degré d'oxydation du noyau pyranique central, ils sont regroupés en une dizaine de classes pouvant être partagées en cinq familles groupées dans le tableau 3 et illustré par la figure 6



**Figure 6:** Différentes classes de polyphénols (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006)**Les enzymes :**

- I- Acetyl CoA carboxylase
- II- Phenylalanine ammonia lyase
- III- Coumarate 4-hydroxylase
- IV- 4-coumarate CoA ligase
- 1- Chalcone synthase
- 2- Chalcone isomérase
- 3- Hydroxy-2 isoflavone synthase
- 4- Flavone synthase
- 5- Flavanone-3 hydroxylase
- 6- Flavonol synthase

**Figure 7 :** Biosynthèse des flavanoïdes (Treki, 2002).

**Tableau 3:** exemples de composés phénoliques et leurs origines (Macheix et *al*, 2005).

Squelette carboné	Classe	Composés	Origine
C6	Phénols simples	Catéchol	
C 6-C1	Acides hydroxybenzoïques	p-Hydroxybenzoïque	Epices, fraise
C 6-C3	Acides hydroxycinnamiques Coumarine	Acides caféique, férulique Scopolétine, esculétine	Pomme de terre, pomme Citrus
C 6-C4	Naphtoquinones	Juglone	Noix
C 6-C2-C6	Stilbènes	Resvératrol	Vigne
C 6-C3-C6	<b>Flavonoïdes</b> - Flavonols <b>- Anthocyanes</b> - Flavanols - Flavanones Isoflavonoïdes	Kaempférol, quercétine Cyanidine, pélargonidine Catéchine, épicatechine Daidzéine	Fruits, légumes, fleurs Fleurs, <b>fruits rouges</b> Pomme, raisin Soja, pois
(C 6-C3)2	Lignanes	Pinorésinol	Pin
(C 6-C3) n	Lignine		Bois, noyau des fruits
(C 15) n	Tanins		Raisin rouge, kaki

### **2.3 Localisation et rôle des polyphénols :**

A l'échelle de la cellule, les composés phénoliques sont principalement répartis dans deux compartiments : les vacuoles et la paroi. Dans les vacuoles, les polyphénols sont conjugués, avec des sucres ou des acides organiques, ce qui permet d'augmenter leur solubilité et de limiter leur toxicité pour la cellule. Au niveau de la paroi, on trouve surtout de la lignine et des flavonoïdes liés aux structures pariétales.

Les composés phénoliques sont synthétisés dans le cytosol. Une partie des enzymes impliquées dans la biosynthèse des phénylpropanoïdes est liée aux membranes du réticulum endoplasmique, où elles sont organisées en métabolons (Winkel, 2004; Macheix *et al*, 2005).

D'autres organites du cytoplasme, comme des vésicules golgiennes ou des chloroplastes, peuvent participer à la biosynthèse des composés phénoliques mais ce ne sont pas des lieux d'accumulation (Macheix *et al*, 2005).

Au sein même des feuilles la répartition des composés est variable, par exemple les anthocyanes et les flavonoïdes sont majoritairement présents dans l'épiderme (Tomas-Barberan et Espin, 2001; Cheynier et Sarni-Manchado, 2006). Les composés phénoliques (tableau 05) interviennent dans un grand nombre de processus physiologiques chez la plante et dans les interactions avec leur environnement, leur structure leur conférant des fonctions très spécifiques (Des jardin, 2008).

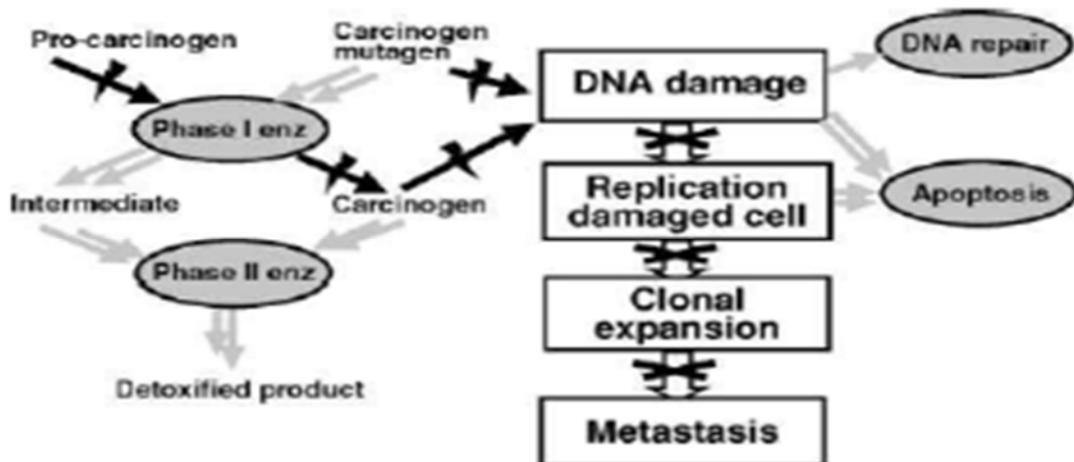
### **2.4 Importance des polyphénols pour l'homme :**

Chez l'homme l'efficacité d'un traitement, comme une alimentation riche en fruits et légumes, est quantifiée via des marqueurs biologiques. Par exemple le taux d'espèces réactives avec l'acide thiobarbiturique est utilisé pour témoigner le niveau d'oxydation des lipides, relatif aux stress oxydatifs (Johnson I T, 2008).

En outre l'efficacité des molécules présentes dans les fruits et légumes, dont les polyphénols, est prouvée *in vitro* mais reste à confirmer *in vivo*, et les doses à prescrire restent difficiles à établir (Johnson I T, 2008).

Les effets bénéfiques chez l'homme, de la consommation d'un fruit ou d'un légume en particulier ne peuvent pas se résumer uniquement à l'effet d'une seule substance (Liu, 2004; Bazzano, 2008).

Ces composés interviennent également à différents stades de développement des cancers, notamment en stimulant la mort de cellule et en inhibant certaines enzymes (Figure 8).



**Figure 8:** Représentation des différentes phases de prolifération du cancer et des potentiels lieux d'action des polyphénols végétaux. Les doubles flèches grises indiquent un effet stimulateur alors que les flèches noires indiquent un effet inhibiteur des phénols.

(Hollamn, 2001).

## II . Notions de cytogénétique :

La cytogénétique tend à se développer rapidement ces dernières années, notamment par l'arrivée sur le marché de nouvelles techniques telles que l'hybridation comparative. Ces techniques, plus rapides, plus simples, permettent de détecter un grand nombre d'anomalies génétiques en un seul test.

La cytogénétique est l'étude des phénomènes génétiques au niveau de la cellule, c'est-à-dire au niveau des chromosomes sans la nécessité d'extraire l'ADN. Les techniques utilisées sont principalement la réalisation de caryotype, les méthodes de FISH (Fluorescent *In-Situ* Hybridation : hybridation in-situ par des sondes fluorescentes), l'utilisation de puces à ADN. En effet, depuis plusieurs années la caryologie, se basant sur des critères tels que : Le nombre, la taille et la forme des chromosomes a permis de mieux comprendre, les relations taxonomiques existant entre les espèces ainsi que, l'histoire évolutive, la répartition

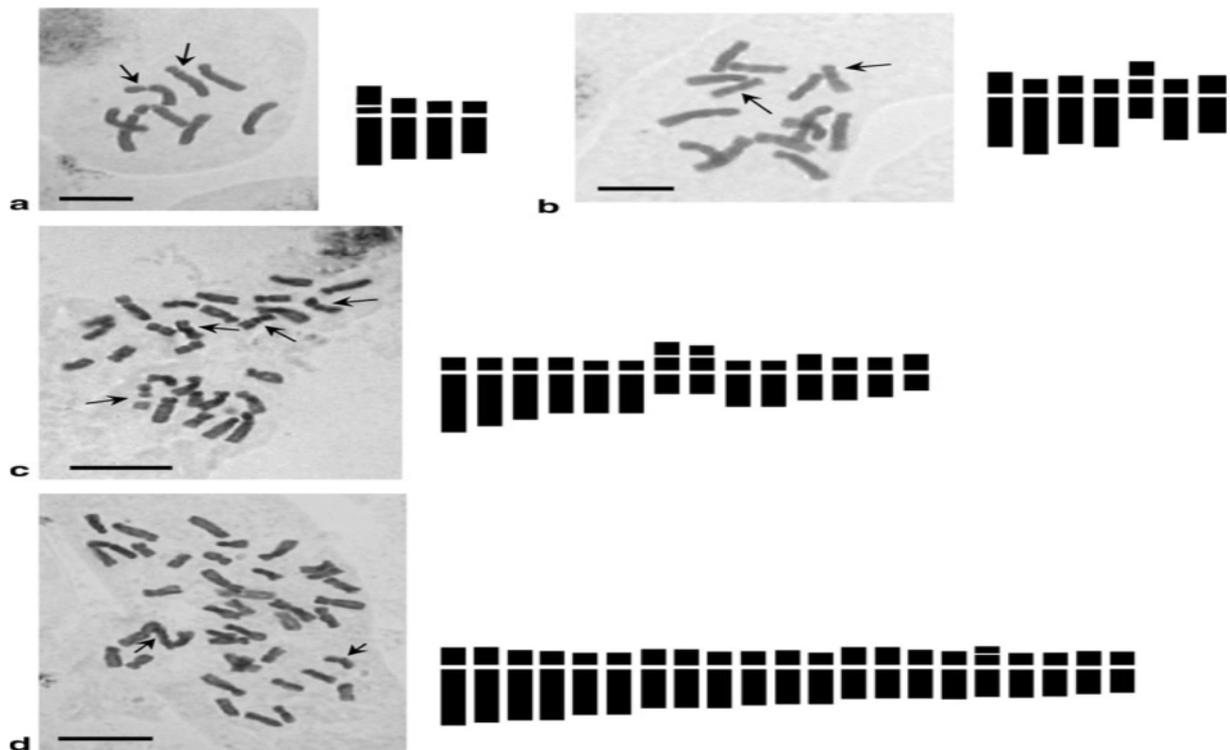
géographique et les aptitudes agronomiques dans le cas des plantes cultivées (BenMalek., 1988).

### 3.1 Variation du nombre chromosomique chez les scilles :

La taille des génomes et notamment le nombre chromosomique et la structure du caryotype, fournissent des données essentielles à la compréhension de l'évolution et de la diversification des plantes (Bennett *et al.*, 2000 ; Lysak *et al.*, 2006 ; Bennett et Leitch, 2005 ; Schubert, 2007). Les scilles en général et le genre *Prospero* en particulier, constituent en cela un excellent modèle (Parker *et al.*, 1991 ; Vaughan *et al.*, 1997 ; Weiss-Schneeweiss et Schneeweiss, 2013).

En effet, le genre *Prospero* est caractérisé par une dysploïdie et une polyploïdie exceptionnelle. Ce genre est remarquable par un nombre chromosomique très variable de  $2n = 8$  à  $2n = 60$  avec un nombre de base allant de  $x = 4$  chez *Scilla obtusifolia* et *S. persica* à  $x = 11$  chez *S. atropana* (Borgen, 1970 ; Speta, 1979 ; Greilhuber *et al.*, 1981). Trois principales espèces sont reconnues comme constituant les génomes de base de ce genre : deux diploïdes, *P. obtusifolium* (Poir.) Speta avec  $x = 4$  et *P. hanburyi* (Baker) Speta avec  $x = 7$  et un complexe polyploïde *P. autumnale* (L.) Speta avec  $x = 5$ ,  $x = 6$  et  $x = 7$ .

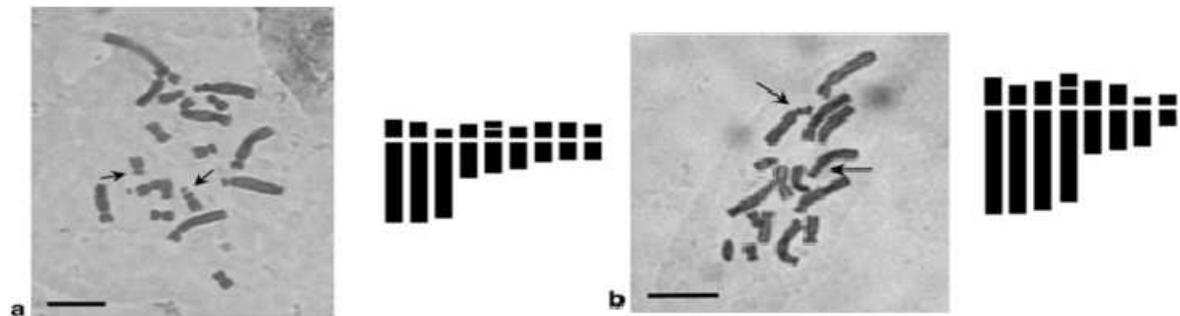
Les caryotypes de *Barnardia numidica* (Poir.) Speta avec  $2n = 18$  ainsi que *Hyacinthoides lingulata* (Poir.) Rothm. avec  $2n = 16$  chromosomes ont été confirmés. (Hamouche et Amirouche 2010).



**Figure 9:** Cliché de métaphase mitotique and idiogrammes correspondant aux espèces *Prospero*.

**a** *P. obtusifolium* avec  $2n = 8$ , **b** *P. autumnale* avec  $2n = 14$ , **c** avec  $2n = 28$ , **d** avec  $2n = 42$ .

Les flèches indiquent les satellites (Hamouche et Amirouche 2010).



**Fig 10 :** Cliché de métaphase mitotique and idiogrammes correspondant aux espèces *Barnardia* et *Hyacinthoides*. **a** *B.numidica* avec  $2n = 18$ , **b** *H. lingulata* avec  $2n = 16$ .

Les flèches indiquent les satellites. (Hamouche et Amirouche 2010).

### 3.2 Structure et morphologie du chromosome métaphasique :

Le chromosome métaphasique est constitué de deux chromatides, chaque chromatide représentant une des deux molécules d'ADN identiques issues de la réplication en phase S.

Ces deux chromatides sont étroitement associées au niveau du centromère, qui constitue la constriction primaire du chromosome et correspond à la zone de fixation sur les fibres du fuseau de division.

La construction centromérique est un repère qui permet de séparer le chromosome en deux régions principales : un bras court (par convention situé au-dessus du centromère) et un bras long (en-dessous du centromère). Les extrémités des bras chromosomiques sont des régions possédant une architecture particulière sur le plan moléculaire et sont appelées télomères. Il y a un télomère pour le bras court et un télomère pour le bras long.

En fonction de la taille respective des bras courts et longs, on reconnaît quatre groupes morphologiques de chromosomes :

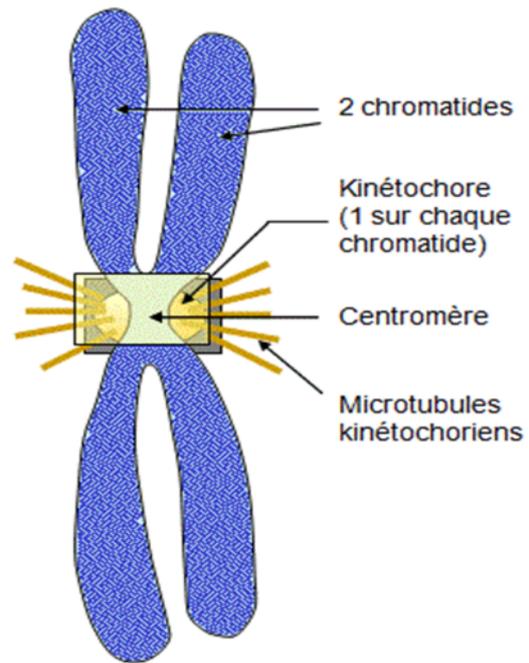
**Chromosomes métacentriques:** Le centromère est en position centrale (position médiane) ce qui lui donne des bras de longueurs à peu près égales.

**Chromosomes sub-métacentriques :** Le centromère est presque en position centrale, les chromatides de ce chromosome présentent des bras de longueurs inégales (un petit bras «p» et un long bras «q»).

**Chromosomes acrocentriques :** Le centromère est plus proche de l'une des deux extrémités (les télomères) le bras court est très bref.

**Chromosome télocentrique:** Présente un centromère très proche de ses télomères.

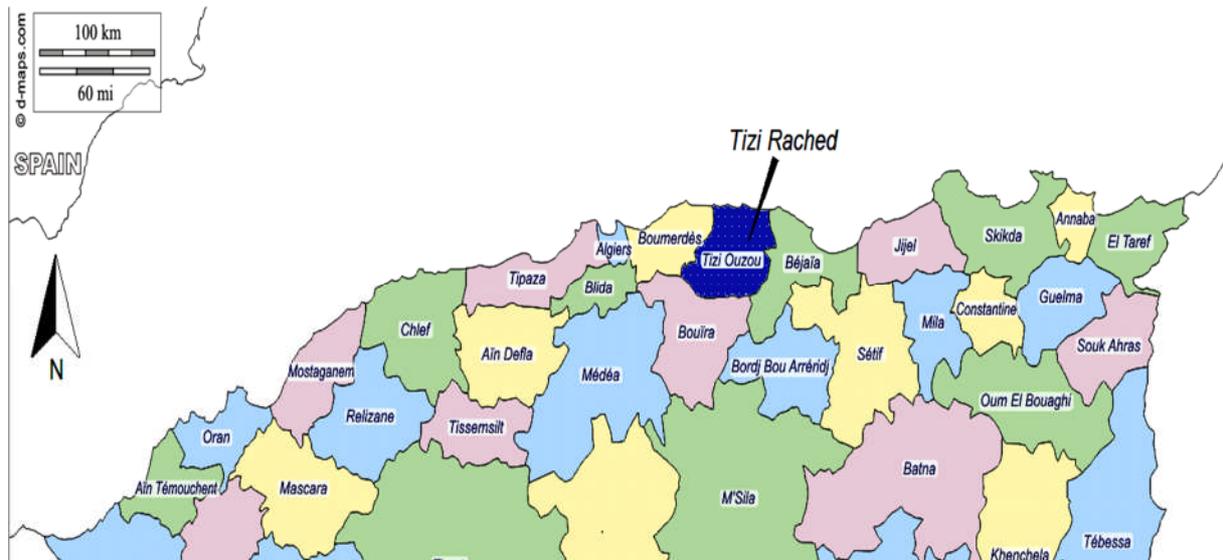
En cas de perte du centromère (anomalie), le chromosome est dit acentrique. D'autres anomalies peuvent provoquer l'apparition d'un chromosome possédant deux centromères nommé: chromosome dicentrique. Celui-ci est instable et peut se casser (lors de la méiose). (Lemondet et Clement, 1983).



**Figure 11** : structure d'un chromosome métaphasique (Dolisi, 2013)

## I Description de la station d'échantillonnage :

Les échantillons des deux espèces *P.fallax* et *H.lingulata* ont été prélevés en Algérie dans la région de Kabylie (Tizi-Rached) à une quinzaine de kilomètres de la wilaya de Tizi-Ouzou, près d'un verger d'Olivier (*Oléa europa*). Les prélèvements ont été effectués respectivement le 30/10/2015, et 06/11/2015. Fig.12.



**Figure 12:** Site de prélèvement des échantillons de *H.lingulata* et *P.fallax*.

Le climat de Tizi Rached est dit tempéré chaud. Les précipitations sont plus importantes en hiver qu'en été. Tizi Rached affiche une température annuelle moyenne de 17.5 °C. Il tombe en moyenne 880 mm de pluie par an.

## II Matériel végétal :

Pour les mesures morphométriques, nous avons considéré les plantes entières, puis les bulbes et les feuilles comme matière première pour les dosages des flavonoïdes, et enfin les racines pour l'étude cytogénétique.

Dix individus ont été prélevés pour chacune des espèces, avant d'être mis en herbier pendant deux semaines.

## 2.1 Feuilles :

Après la mise en herbier, les feuilles des espèces récoltées ont été d'abord coupées en lanières et mises dans des boîtes de Pétri puis à l'étuve pour sécher pendant une semaine. Après quoi nous avons broyé les feuilles pour obtenir une poudre fine, qui servira à la préparation des différents extraits. Fig.13.



**Figure 13 :** Feuilles de *H.lingulata* et *P.fallax* mises en boîte de pétrie avant séchage et avant broyage. (Labo CIV 2016)

## 2.2 Bulbes :

Nous avons suivi la même procédure que celle décrite pour les feuilles. En effet, après échantillonnage et la mise en herbier, les bulbes ont été séchés à l'étuve pendant une semaine. Ils sont ensuite broyés afin d'obtenir une poudre qui servira pour la préparation des différents extraits aussi. fig.14.



**Figure 14:** Bulbes de *H.lingulata* et *P.fallax* mis en boîte de pétrie avant séchage et avant broyage. (Labo CIV 2016)

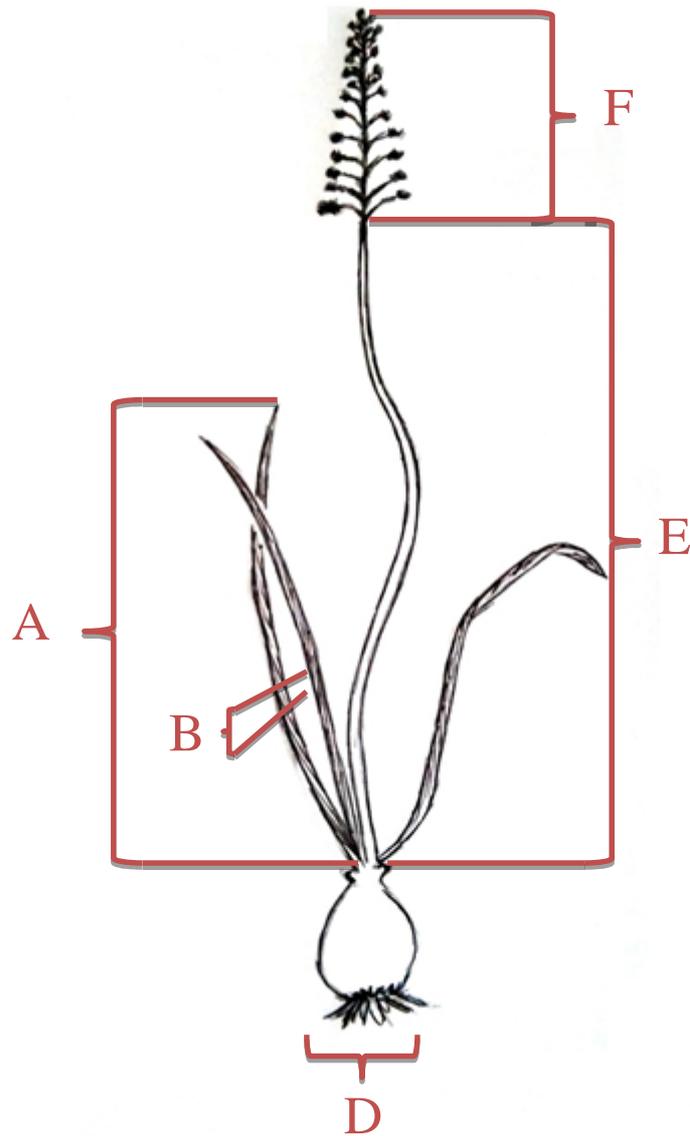
### III Méthodes

#### 3.1 Mesures morpho-métriques de *H. lingulata* et *P.fallax* :

Des mesures morphométriques à l'aide de papier millimétré ont été effectuées sur les feuilles, les hampes florales, les inflorescences et bulbes des deux espèces.

Le schéma décrivant la méthodologie suivie est résumé dans la figure 15.

Cette étude a été motivée par les différences morphologiques observées chez les deux espèces.



**Figure 15 :** caractères morphologiques quantitatifs mesurés chez les deux espèces *Prospero fallax* et *Hyacinthoides lingulata*, avec A (longueur de la feuille), B (largeur de la feuille), C (nombre de feuilles), D (diamètre du bulbe), E (longueur de la hampe florale), F (longueur de l'inflorescence), G (longueur du pédoncule floral), H (nombre de fleurs).

### 3.2 Extraction des flavonoïdes par hydrolyse acide :

Nous nous sommes intéressés aux analyses biochimiques de 3 classes de flavonoïdes, à savoir : (Les C-glycosides, les Anthocyanes et les aglycones flavoniques), extraites des feuilles et bulbes de *H.lingulata* et *P.fallax*.

La technique consiste en l'extraction et la séparation des flavonoïdes par hydrolyse acide et à chaud de la poudre végétale (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 extraction préliminaire à l'éther Diéthylique qui permet de récupérer les aglycones libres ou moyennement polaires.
- ❖ Une fraction de **C-glycosides** et d'**anthocyanes** récupérée par extraction au n-butanol.

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

Le schéma d'extractions par hydrolyse acide est résumé dans la figure suivante :

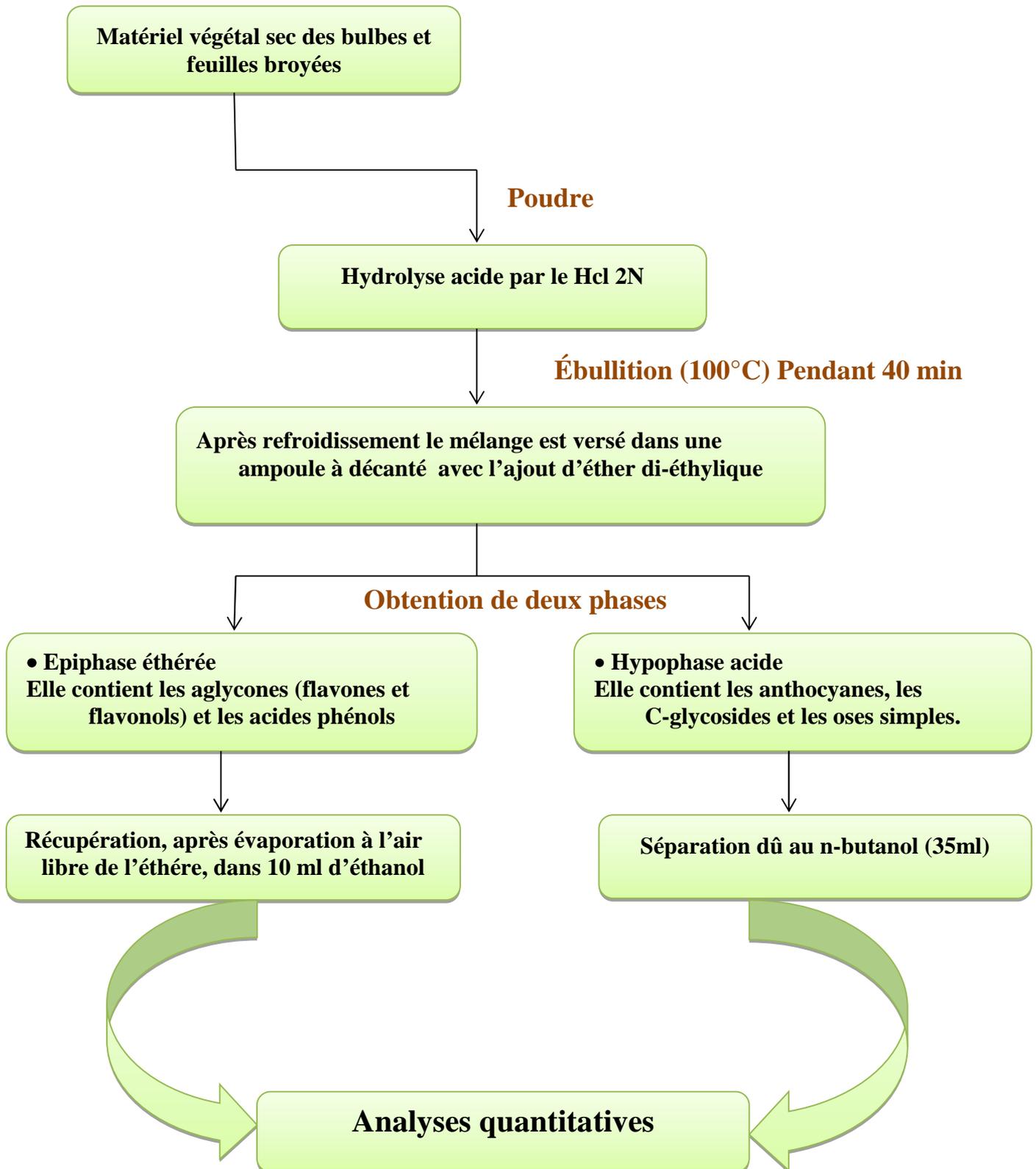


Figure 16 : Etapes de l'extraction par hydrolyse acide (Lebreton 1967).

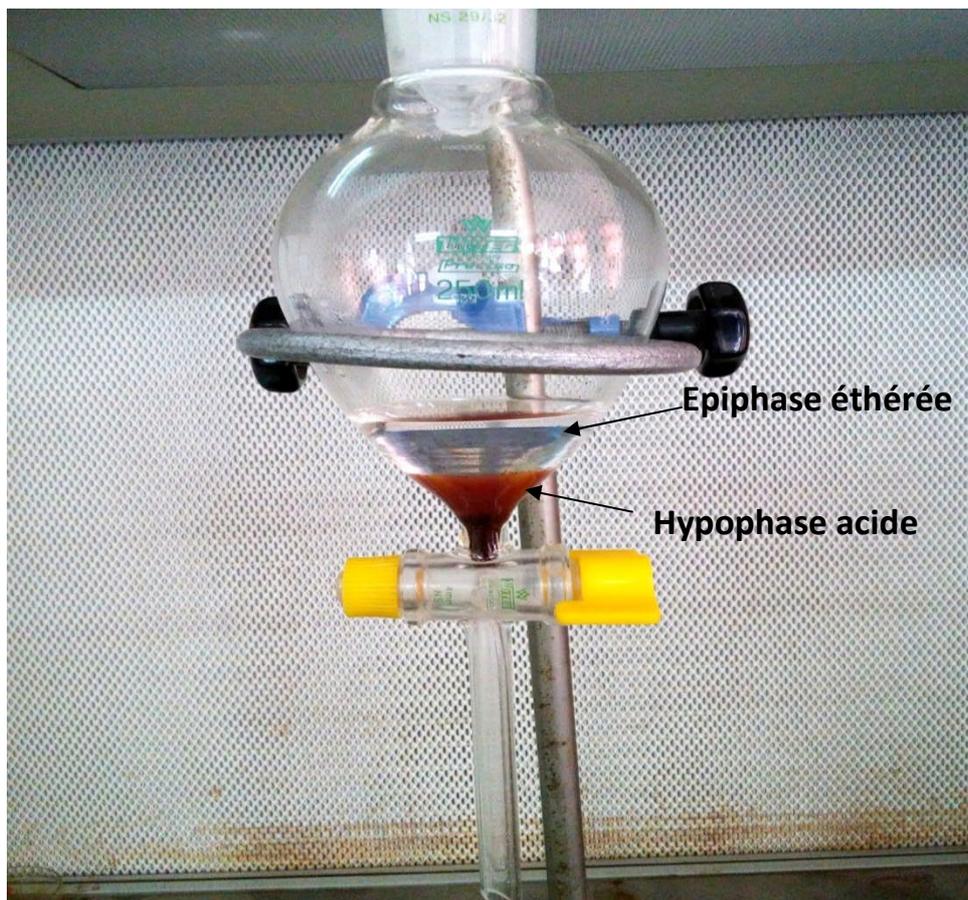
### ❖ Epiphase étherée :

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 5 ml d'éthanol, puis conservé au frais avant d'être soumis à une analyse quantitative par spectrophotocolorimétrie

### ❖ Hypophase acide :

De couleur rougeâtre elle contient les anthocyanes, les C-glycosides et les oses simples. Elle est récupérée et additionnée à 35 ml 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 et évaporée à l'aire libre.

Le résidu sec est repris dans 5 ml de méthanol, qui permet de récupérer les aglycones polyhydroxylés et la plupart des glycosides, puis conservé par la suite au frais avant d'être soumis à une analyse quantitative par spectrophotocolorimétrie fig.17.



**Figure 17:** Ampoule à décanter contenant une épiphase étherée et une hypophase acide (Laboratoire de CIV, 2016)

### 3.2.1. Analyses quantitatives :

#### a) Dosage des proanthocyanes :

La lecture des extraits s'établit par spectrophotométrie à 250 nm 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).

$$T(\text{mg/g})=5,210^{-2} \cdot \text{DO} \cdot \text{V} \cdot \text{d}/\text{p}$$

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 exprimé en Orientine et calculée par la formule suivante :

$$T(\text{mg/g})=2,3710^{-2} \cdot \text{DO} \cdot \text{V} \cdot \text{d}/\text{p}$$

DO : densité optique

V : volume de 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 ( $\text{AlCl}_3$ ) 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 première dilution se fait dans de l'éthanol (extrait éther +éthanol 95°)
- La deuxième dilution se fait dans la solution d'AlCl<sub>3</sub> (extrait étheré+AlCl<sub>3</sub> dans l'éthanol 95°).

La solution d'AlCl<sub>3</sub> 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 est la suivante :

$$T(\text{mg/g}^{-1})=1,310^{-2}\Delta DO.V.d/p$$

$\Delta DO$  : densité optique au pic différentiel égale à  $DO(\text{AlCl}_3)-D.O(\text{éthanol}95^\circ)$

$\varepsilon$  : coefficient d'absorption de la Quercétine égale à 302g

V : volume de la solution éthanoïque

d : facteur de dilution

p : poids sec du matériel végétal hydrolysé en g.



**Figure 18:** Spectrophotomètre (Laboratoire commun de microbiologie de UMMTO, 2016)

### 3.3 Etude cytogénétique de *H.lingulata* et *P.fallax* :

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

Le protocole expérimental préconisé est celui de Jahierr et al (1992). Ce protocole, comporte les étapes suivantes :

➤ **Préfixation :**

Après la germination les racines de 0.5 à 1 cm sont prétraitées par immersion dans une solution de  $\alpha$ -bromonaphtalène (agent mitoclasique qui empêche la formation du fuseau achromatique) pendant 5 heures à température ambiante.

➤ **Rinçage :**

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

➤ **Fixation :**

Est réalisé dans un mélange éthanol-acide acétique (3 :1 v/v) pendant 24 heures à 4 C° ou bien à température ambiante. Cette étape a pour but de bloquer toute évolution des divisions cellulaires et de conserver l'intégrité structurale des chromosomes.

➤ **Stockage :**

Les caryotypes germés ont été stockés dans l'éthanol 70° à froid. Ils peuvent être conservés pendant une longue période.

➤ **Hydrolyse :**

Elle a été réalisée après rinçage dans de l'eau distillée, dans une solution d'HCL 1 N au bain marie à 60 C°, pendant 5 minutes afin d'obtenir un bon étalement des cellules et des chromosomes entre lames et lamelle.

➤ **Coloration :**

Cette technique est appelée « Feulgen » elle a été mise au point par Feulgen et Rossen Beck en 1914. Elle se fait dans le carmin acétique pendant 20 minutes, à chaud. Ce dernier se fixe sur les groupements aldéhyde libérés par l'HCL, et colore les chromosomes en rose fig.19.

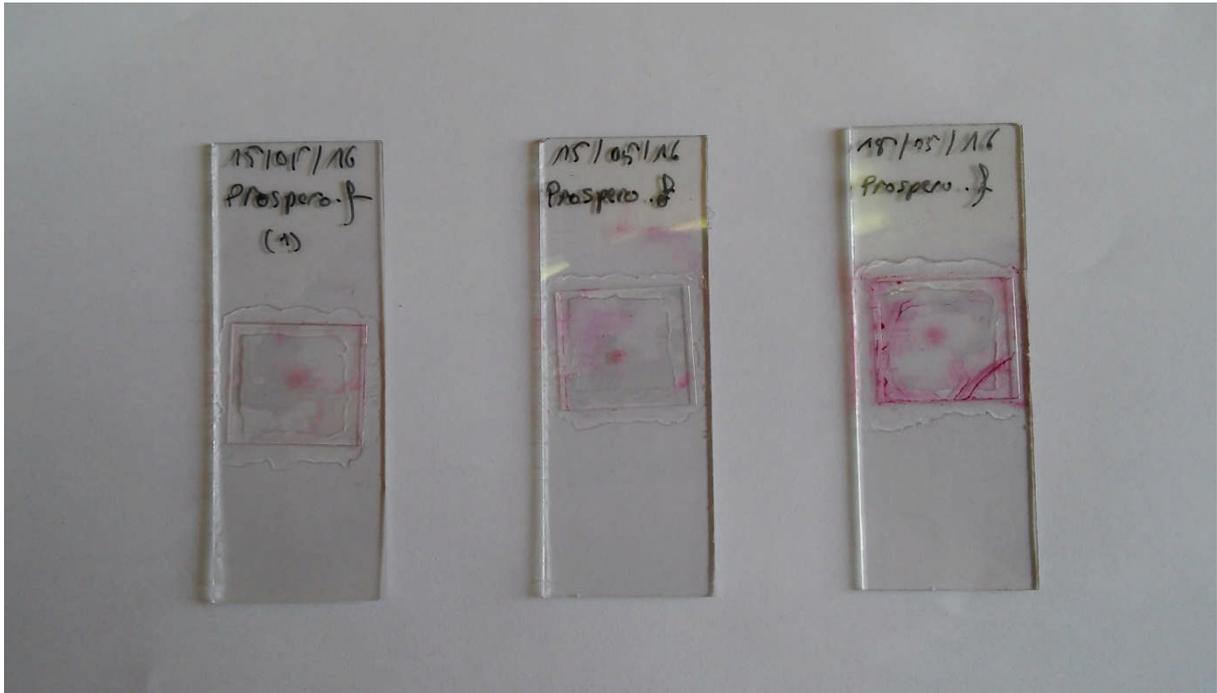


**Figure 19:** Racines de *Prosperof allax* colorées au carmin acétique (Labo de CIV, 2016)

➤ **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°C° 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 fig.20.

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



**Figure 20:** Racines de *Prospero fallax* montées sur lames (Labo de CIV, 2016)

## **I Variabilité morphologique entre *Prospero fallax* et *Hyacinthoides lingulata* :**

Pour comprendre la diversité et l'origine de la variabilité phénotypique de *Prospero fallax* et *Hyacinthoides lingulata*, nous avons appliqué le test de student.

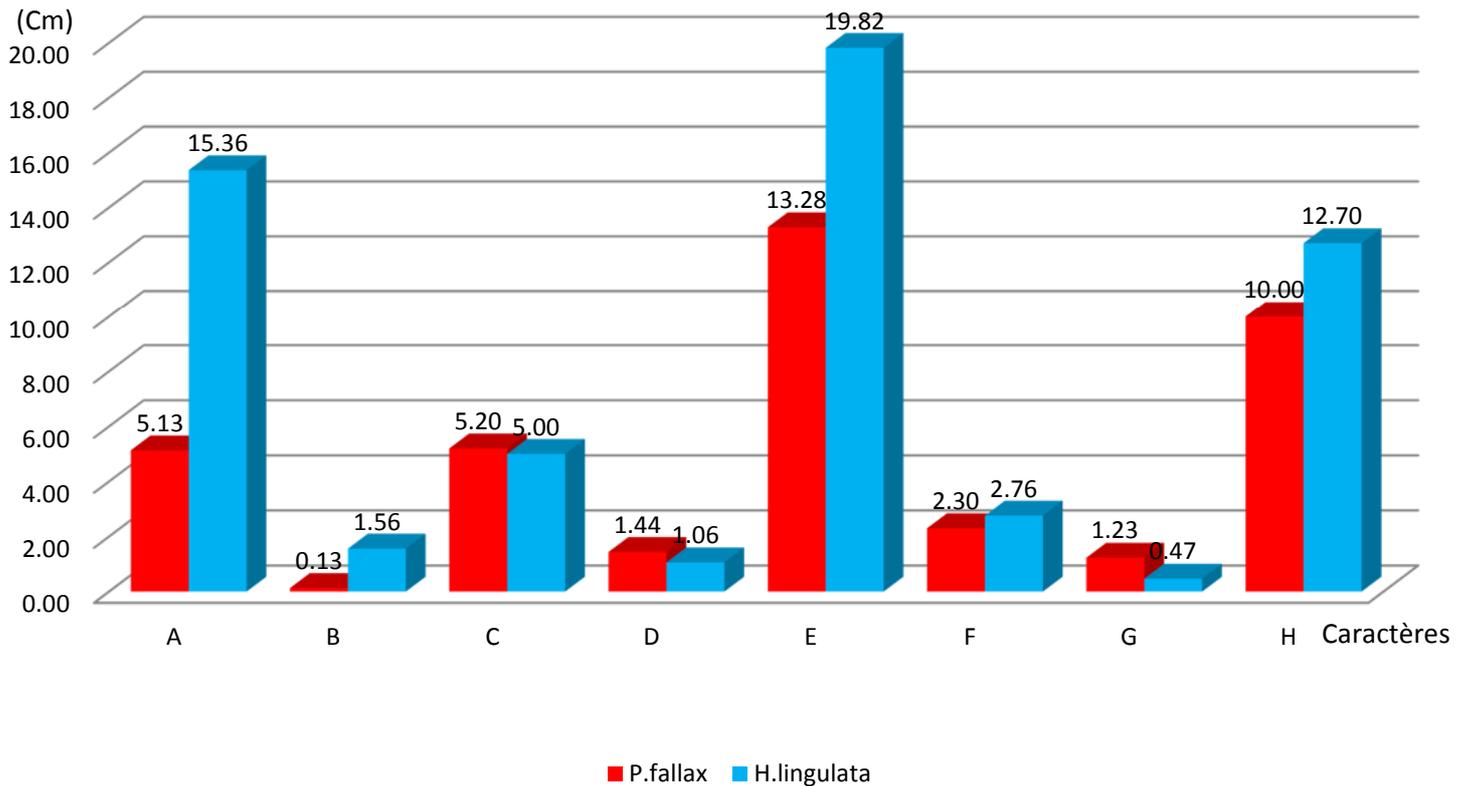
Les caractères mesurés concernent : (A) la longueur des feuilles, (B) largeur des feuilles, (C) nombre de feuilles, (D) diamètre du bulbe, (E) longueur de la hampe florale, (F) longueur de l'inflorescence, (G) longueur du pédoncule florale et (H) le nombre de fleurs.

Les caractères mesurés sont groupés dans les tableaux 1 et 2 (annexe 1).

### **1.2 Comparaison des moyennes des différents caractères étudiés**

Pour appréhender la variabilité morphologique entre les deux espèces de scilles (*Prospero fallax* et *Hyacinthoides lingulata*), huit caractères quantitatifs (A, B, C, D, E, F, G, H) sont mesurés sur dix individus de chacune des deux espèces. Nous avons ensuite comparé les moyennes de chaque caractère par le test d'égalité des espérances par le Test de Student ou Test t à P=5%.

Les différences entre les moyennes des caractères morphologiques étudiés, au sein de chacune des deux espèces sont données dans le tableau 3 annexe 1 et sont matérialisés par le graphe de la figure 21.



**Figure 21:** Moyennes des caractères morphologiques mesurées dans les cas de *Prospero fallax* et *Hyacinthoides lingulata*.

L'étude des caractères morphométriques des deux espèces *P.fallax* et *H.lingulata* a montré que, la longueur de la feuille, la longueur de la hampe florale ainsi que la longueur de l'inflorescence sont plus importantes chez *H.lingulata* avec des valeurs respectives de 15,36 ; 19,82 ; 2,76 cm par rapport à *P.fallax*, avec des valeurs respectives de 5,13 ; 13,28 ; 2,30cm, par contre la longueur du pédoncule floral est plus importante chez *P.fallax* que chez *H.lingulata* avec des valeurs respectives de 1,23 ; 0,47 cm. Le nombre de feuilles est plus élevé chez *P.fallax* par rapport à *H.lingulata* avec des valeurs moyennes respectives de 5,20 ; 5,00 ; tandis que le nombre de fleurs est plus importants chez *H.lingulata* que *P.fallax* avec des valeurs moyennes respectives de 12,70 ; 10,00, et enfin le diamètre du bulbe de *P.fallax* est plus grand que celui de *H.lingulata* avec des valeurs respectives de 1,44 ; 1,06 cm.

Pour les caractères A, B, E, G, H, le test  $t=0,05$  a montré une différence significative. Pour les caractères C, D, F, les différences sont considérées égales du point de vue statistique.

Ces différences seraient dues à la physiologie et au patrimoine génétique des deux espèces étudiées.

Les valeurs du test bilatéral sont données dans le tableau 1 (annexe 5).

## II Dosage quantitatif des polyphénols de *Prospero fallax* et *Hyacinthoides lingulata* :

Les résultats des dosages des teneurs absolues en substances phénoliques (anthocyanes, c-glycosides et aglycones flavoniques) extraits des feuilles et bulbes de chacune des deux espèces étudiées *Prospero fallax* et *Hyacinthoides lingulata* sont groupés dans les tableaux 4, 5, 6, 7, 8, 9 (annexe 4).

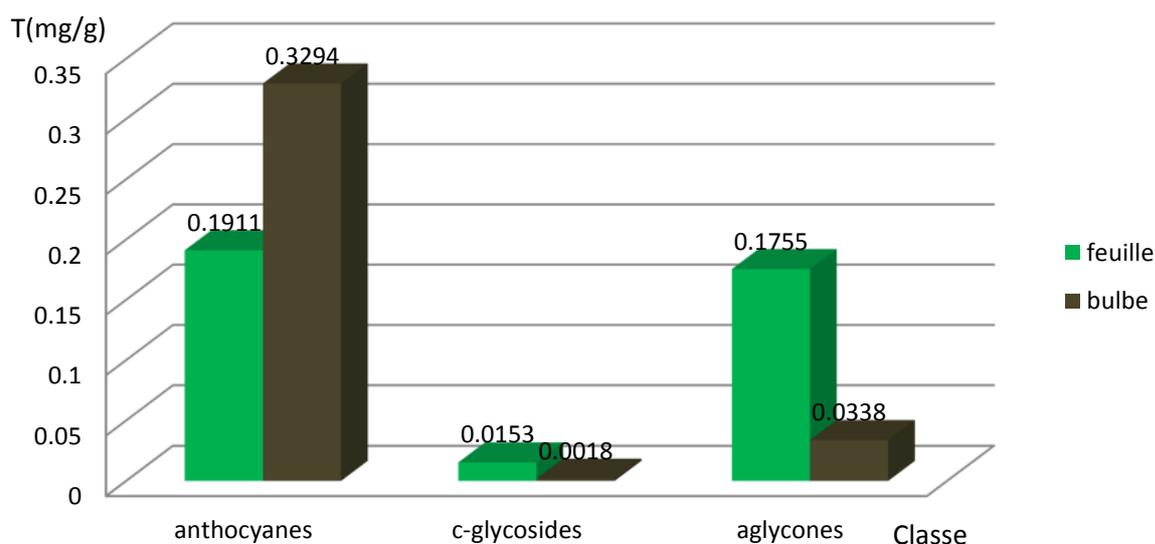
### 2.1. Comparaison intra-spécifique :

#### 2.1.1. Cas de *Prospero fallax* :

La figure ci-dessous montre les résultats de l'étude comparative des teneurs absolues des substances phénoliques des différents organes étudiés. Les feuilles sont les plus riches en c-glycoside et en aglycones flavoniques avec des valeurs respectives de 0,0153 ; 0,1755 mg/g par rapport aux teneurs des bulbes qui sont respectivement de 0,0018 ; 0,0338 mg/g, tandis que la teneur en anthocyanes est plus élevée dans les bulbes que dans les feuilles avec des valeurs respectives de 0,3294 ; 0,1911 mg/g. fig22.

Le test  $t=0,05$  a montré une différence significative des teneurs en anthocyanes en aglycones flavoniques et en C-glycosides entre les feuilles et les bulbes.

Les valeurs du test bilatéral sont données dans le tableau 11 (annexe 5).



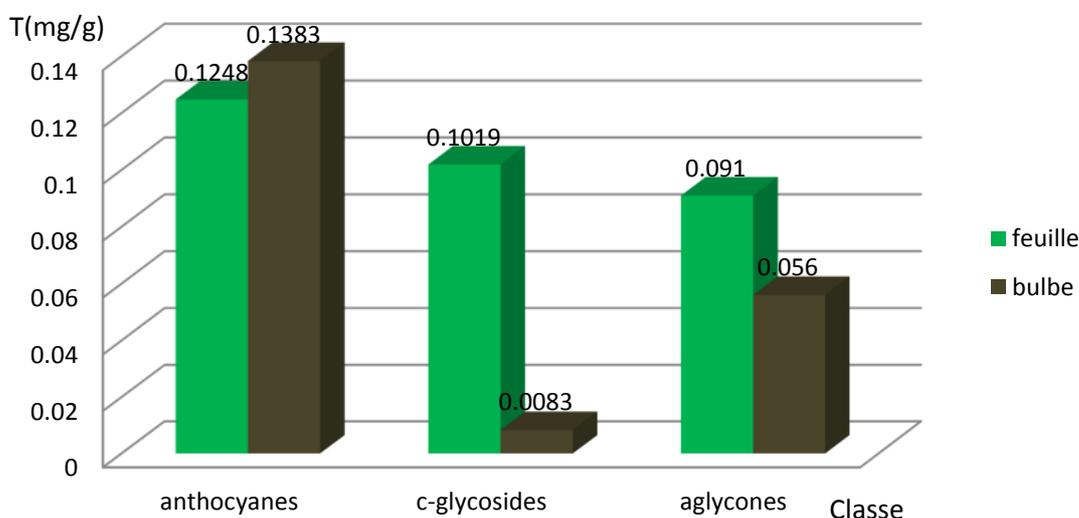
**Figure 22:** Moyennes des teneurs absolues des trois classes des flavonoïdes dans les feuilles et bulbes de *prospero fallax*.

### 2.1.2. Cas de *Hyacinthoides lingulata* :

La figure ci-dessus montre que les feuilles sont plus riches en aglycones flavoniques et en C-glycosides avec des valeurs respectives de 0,091 ; 0,1019 mg/g par rapport aux bulbes avec des valeurs respectives de 0,056 ; 0,0083 mg/g, tandis que la teneur en anthocyanes est plus élevée dans les bulbes que dans les feuilles avec des valeurs respectives de 0,1383 ; 0,1248 mg/g. fig23.

Le test  $t=0,05$  a montré une différence hautement significative des teneurs en C-glycosides, en aglycones flavoniques. Pour la teneur en anthocyanes des feuilles et des bulbes, les différences sont considérées égales du point de vue statistique.

Les valeurs du test bilatéral sont données dans le tableau 12 (annexe 5).



**Figure 23:** Moyennes des teneurs absolues des trois classes des flavonoïdes dans les feuilles et bulbes de *hyacinthoides lingulata*.

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 de 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 la Glomeromycète est mal connu.

Les espèces, objet de notre étude trouvent leur apogée en automne, saison caractérisé par une chute brutale de la température. Donc l'accumulation des polyphénols dans les feuilles, serait plus conséquente.

L'accumulation de flavonoïdes est une stratégie adoptée par ces plantes pour lutter contre les gelées étant donné que les bulbes enfouis dans le sol se trouvent mieux protégés (espèces hémicryptophytes) par transfert de chaleur par convection.

Cette différence de teneurs en flavonoïdes entre les deux espèces étudiées pourrait être due à des différences physiologiques ou génétiques.

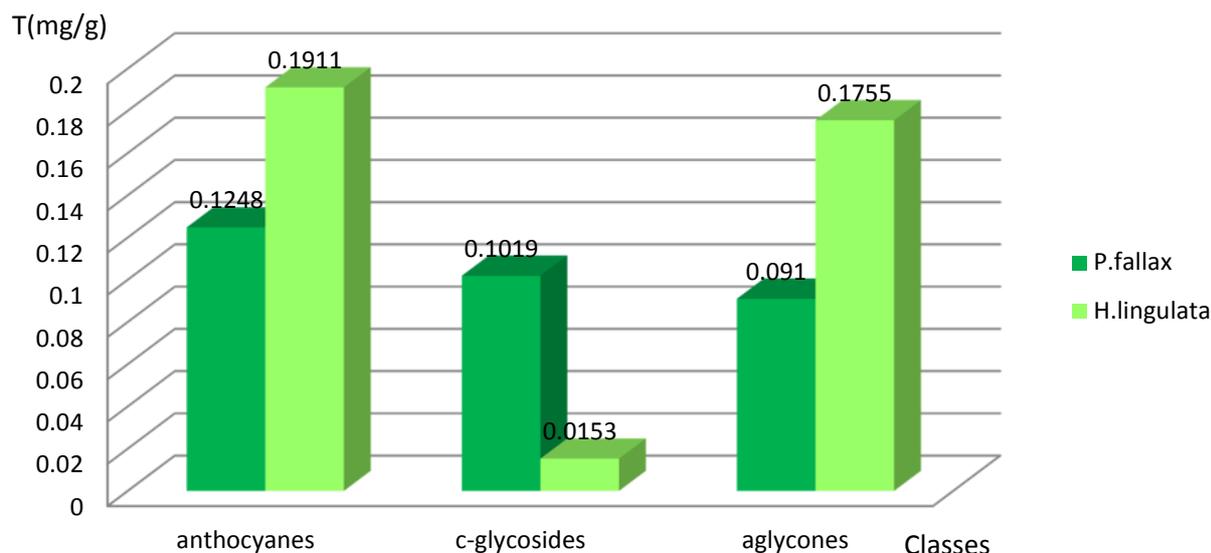
## **2.2. Etudes comparative interspécifique des organes aériens (feuilles) et souterrains (bulbes) :**

### **2.2.1 Feuilles :**

Les teneurs absolues moyennes en anthocyanes, C-glycosides et aglycones flavones, sont exprimées en milligrammes par gramme de matière végétale sèche dans les feuilles des trois individus des deux espèces étudiées.

Les résultats obtenus montrent que les teneurs moyennes en anthocyanes et en aglycones flavoniques dans les feuilles de l'espèce *hyacinthoides lingulata* sont plus élevées par rapport aux teneurs moyennes dans les feuilles de l'espèce *prospero fallax* avec des valeurs respectives de 0.1911 et 0.1248 mg/g, et de 0.1755 et 0.0910 mg/g pour les anthocyanes, et les aglycones flavoniques.

Tandis que les teneurs moyennes en C-glycosides s'avèrent être plus importantes dans les feuilles de *prospero fallax* par rapport aux feuilles de *hyacinthoides lingulata* avec des valeurs respectives de 0.1019 et 0.0153mg/g. fig 24.



**Figure 24:** Teneurs absolues moyennes des 3 classes des flavonoïdes dans les feuilles de *prospero fallax* et *hyacinthoides ligulata*.

Les résultats de cette étude montrent que les teneurs moyennes en C-glycosides dans les feuilles de *hyacinthoides lingulata*, et en aglycones flavoniques dans les feuilles de *prospero fallax* sont les plus faibles avec 0.0153 et 0.0910 mg/g, suivie par les teneurs moyennes en C-glycosides et en anthocyanes dans les feuilles de *prospero fallax* avec des valeurs respectives de 0.1019 et 0.1248 mg/g. Les teneurs moyennes en aglycones flavoniques et en anthocyanes dans les feuilles de *hyacinthoides ligulata* sont les plus élevées avec 0.1755 et 0.1911 mg/g.

L'analyse statistique des résultats par le test  $t=0,05$  a montré des différences hautement significatives dans la Composition des feuilles des deux espèces.

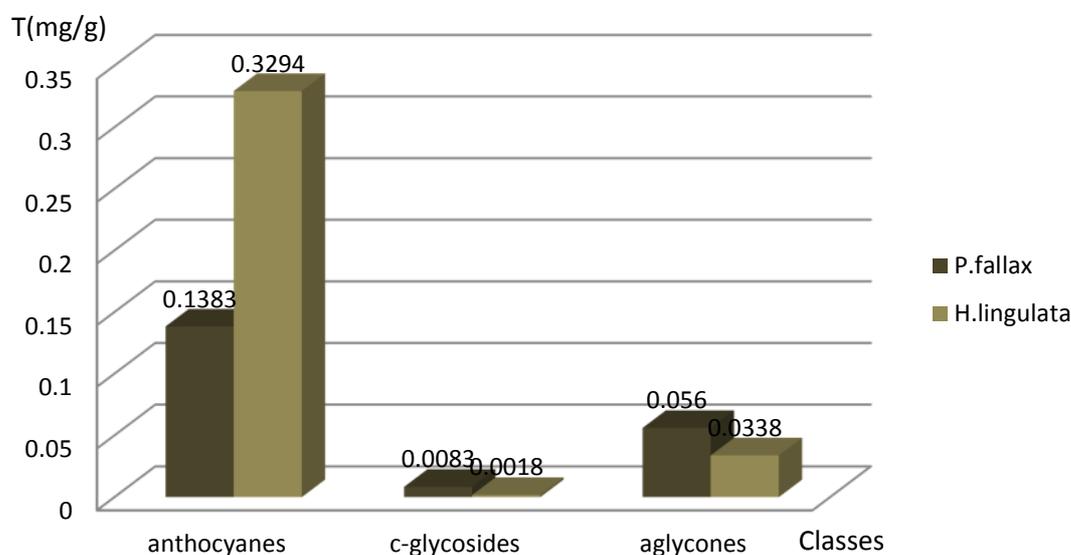
Les valeurs du test bilatéral sont données dans le tableau 13 (annexe 5).

### 2.2.2 Bulbes :

Les teneurs absolues moyennes en anthocyanes, c-glycosides et aglycones flavones, sont exprimées en milligrammes par gramme de matière végétale sèche dans les bulbes des trois individus des deux espèces étudiées.

Les teneurs moyennes en C-glycosides et en aglycones flavoniques dans les bulbes de *prospero fallax* sont plus élevées par rapport aux teneurs moyennes dans les bulbes de *hyacinthoides lingulata*, avec des valeurs respectives de 0.0083 et 0.0018 mg/g et de 0.056 et 0.0338 mg/g pour les C-glycosides et les aglycones flavoniques, tandis que les teneurs moyennes en anthocyanes dans les

bulbes de *hyacinthoides lingulata* sont plus élevées par rapport à celles de *prospero fallax* avec 0.3294 et 0.1383 mg/g. fig 25.



**Figure 25:** Teneurs absolues moyennes des 3 classes des flavonoïdes dans les bulbes de *prospero fallax* et *hyacinthoides lingulata*.

Les résultats de cette études montrent que les teneurs moyennes en anthocyanes dans les bulbes des deux espèces *H.lingulata* et *P.fallax* sont les plus élevées avec des valeurs respectives de 0,3294 et 0,1383 mg/g, suivie des teneurs moyennes en aglycones flavoniques avec 0,056 et 0,0338 mg/g pour *P.fallax* et *H.lingulata*, et enfin les teneurs moyennes en C-glycosides qui semblent être les plus faibles avec des valeurs de 0,0083 mg/g pour *P.fallax* et 0,0018 mg/g pour *H.lingulata*.

L'analyse statistique par le test  $t=0,05$  montré des différences significatives pour les teneurs en aglycones flavoniques, en anthocyanes. Pour les teneurs en C-glycosides des bulbes des deux espèces, les différences sont considérées égales du point de vue statistique.

Les valeurs du test bilatéral sont données dans le tableau 14 (annexe 5).

Les composés phénoliques peuvent avoir un rôle de signal (Treutter, 2006). En effet, les flavonoïdes permettent par exemple la mise en place de la symbiose entre les Fabacées et les bactéries, ce qui permet à ces plantes de fixer directement l'azote atmosphérique. Ils participent également aux phénomènes de pollinisation puisqu'ils sont responsables de la coloration des fleurs (anthocyanes) (Macheix *et al*, 2005).

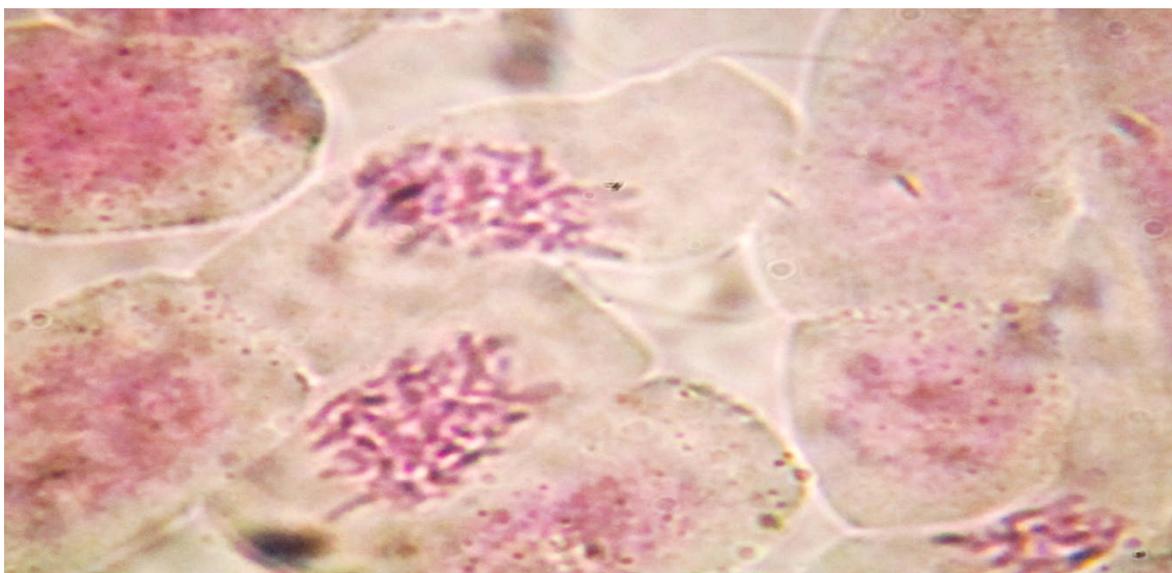
De plus les flavonoïdes ont un rôle de filtre contre le rayonnement UV, ce qui explique leur localisation dans les tissus externes (Gould et Lister, 2006). Enfin les flavonoïdes comme les dérivés hydroxycinnamiques jouent un rôle important dans la résistance des plantes aux stress environnementaux (Walton et Brown, 1999). Lors de blessures ou d'attaques de pathogènes fongiques et bactériens, la synthèse de composés phénoliques est stimulée ou induite (Sawa, 1999).

### III Etude Cytogénétique :

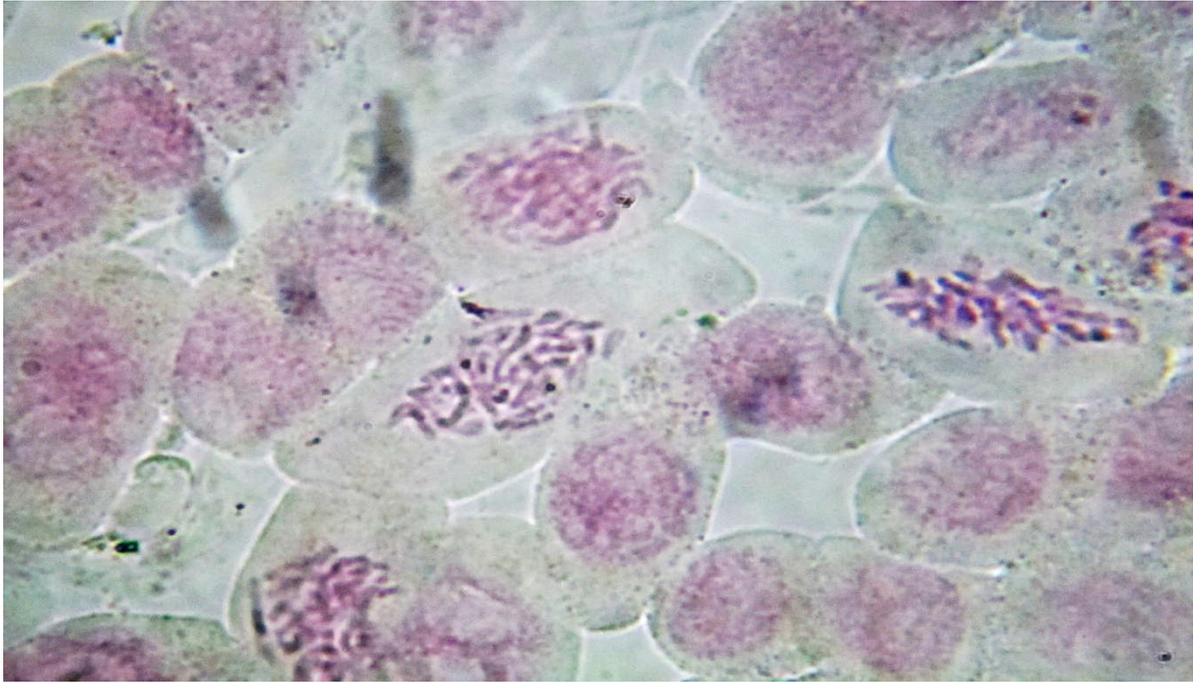
De nombreux essais ont été tentés dans l'espoir de trouver des plaques métaphasiques assez nettes qui nous permettraient de réaliser le dénombrement chromosomique de *Prospero fallax* uniquement, (car *Hyacinthoides lingulata* n'a pas réussi à germer). Le dénombrement s'est avéré difficile suite à la mal fixation probable des échantillons dans le mélange Ethanol-Acide acétique (3 :1 v/v), et à la quantité insuffisante de racines dont nous disposions pour refaire une nouvelle tentative.

Pour chaque essai, nous avons pu compter approximativement un nombre de 25 chromosomes. En effet, en se référant aux travaux de Hamouche et Amirouche (2010) qui ont attesté du caractère polyploïde en travaillant sur 5 espèces de hyacinthacées échantillonnées sur une vingtaine de sites allant du mont du cheréa jusqu'à la forêt de yakouren en Kabylie. En effet, ils ont dénombré les chromosomes de *Prospero autumnale*, avec  $2n = 14$ ,  $2n = 28$ , et  $2n = 42$ . Ainsi nous pouvons situer *Prospero fallax* parmi les *Prospero autumnal* avec  $2n = 28$  chromosomes fig 26, 27.

L'observation de nos échantillons au microscope photonique nous révèle que l'espèce *P.fallax* est caractérisée par un nombre de chromosome  $2n=28$ . Ce nombre est compris dans ceux trouvés par Amirouche et Hamouche (2010).



**Figure 26:** Plaque métaphasique de *Prospero fallax*, observé au grossissement  $G=40\times 10\times 5$ . (CHU Tizi-Ouzou, 2016)



**Figure 27** : Plaque métaphasique de *Prospero fallax*, observé au grossissement  $G=40\times 10\times 5$ .  
(Laboratoire CIV, 2016)



**Figure28** : Cliché d'une plaque métaphasique de *Prospero autumnal* avec  $2n = 28$ .  
(Hamouche et Amirouche, 2010)

## Conclusion

Au terme de ce travail, il a apparu clairement que certains caractères étudiés des deux espèces *Prospero fallax* et *Hyacinthoides lingulata* présentent des différences plus ou moins significatives. Certains caractères sont plus développés chez l'une ou l'autre des deux espèces.

Les scilles sont des plantes intéressantes, à intérêts multiples, en particulier pour leur concentration en substances antioxydantes dans leurs bulbes et leurs feuilles.

Suite à une comparaison inter-spécifique des feuilles et des bulbes des deux espèces, il s'est avéré que les feuilles de *Hyacinthoides lingulata* sont plus riches en anthocyanes (0.1911mg/g) et en aglycones flavoniques (0.1755 mg/g), alors que les feuilles de *Prospero fallax* sont plus riches en C-glycosides (0.1019 mg/g).

Concernant les bulbes, on a constaté que les bulbes de *Prospero fallax* sont plus riches en C-glycosides (0.0083mg/g) et en aglycones flavoniques (0.056mg/g), tandis que les bulbes de *Hyacinthoides lingulata* sont plus riches en anthocyanes (0.3294 mg/g).

Après analyse des densités optiques au spectrophotomètre, nous avons constaté chez les deux espèces étudiées que les feuilles sont plus riches en aglycones flavoniques et en C-glycosides comparées aux bulbes, alors que les bulbes sont plus riches en anthocyanes.

L'étude cytogénétique, qui n'a pas pu être faite dans le cas de *Hyacinthoides lingulata* suite à la non-germination des bulbes de celle-ci, a été tentée uniquement sur *Prospero fallax* par la méthode de squash. Ainsi, le nombre chromosomique dénombré est approximativement égale à  $2n=28$  chromosomes.

La connaissance des teneurs en polyphénols des scilles informe les consommateurs sur leurs effets bénéfiques sur la santé. En effet, ces données sur leurs teneurs en antioxydants constituent des informations nutritionnelles supplémentaires qui faciliteraient une meilleure intégration des scilles automnales parmi les plantes à vertus thérapeutiques.

La beauté de ces espèces en ferait un bon spécimen à intérêt ornemental. Il serait aussi intéressant d'étudier le caryotype des scilles et envisager un séquençage plus large du génome en vue d'en isoler des gènes qui seraient potentiellement intéressants du point de vue cultural ou économique.

**Références bibliographiques**

**AKOWAH GA.,Zhari I.,Norgyati I.,Sadikoun A. et Khamsah SM(2004)** The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of orthosiphon stamenes and evaluation of the free radical scavenging activity. *Food chemistry* 87: 559-566.

**Alothman N .,Bhat R. et Karm AA.**Antioxydant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia,extracted with different solvents *food chemistris* 38: 116-122.

**APG I (1998)** An ordinal classification of the families if flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 85 (4): 531-553.

**APG II (2003)** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *Botanical Journal of the Linnean Society* 141: 399-436.

**APG III (2009)** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161 (2): 105-121.

**BEN MALEK S., GODELLE B., CARTIER D., SILJAK-YAKOVLEV S. (1988).**

Tentative de détermination du sexe chez le Palmier dattier par cytométrie en flux. *In* Actes de la Reunion du Groupe de travail "Cytologie et Cytogénétique" de l'INRA.

Pp : 37-39.

**Bennett M. D., Bhandol P., Leitch I. J. (2000)** Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses - 807 new estimates. *Annals of Botany* 86: 859-909.

**Bennett M. D., Leitch I.J. (2005)** Nuclear DNA Amounts in Angiosperms: Progress, Problems and Prospects. *Annals of Botany* 95: 45-90.

**BRUNETON J.(1999).** Pharmacognosie, photochimie, plantes médicinales. 3éme.

Ed : Tec & D.

**Cheynier V.(2005).** Polyphenols in food are more complex than often thought.

*Amirican journal.Clinical Nutr.*81 :Pp : 223S-229S.

**Cronquist A. (1981).** An integrated system of classification of flowering plants.

Colombia university. Pp: 1256.

- Ferguson LR., (2000)** Role of plant polyphenols in genomic stability rotation research. 475:89-111.
- Greilhuber J., Deumling B., Speta F. (1981)** Evolutionary aspects of chromosome banding Heterochromatin, Satellite DNA and Genome size in *Scilla* (Liliaceae). *Ber Deutsch Bot Ges Bd* 94:249-266.
- Hammouche Y., Amirouche N., Misset M-T., Amirouche R. (2010)** Cytotaxonomy of autumnal flowering species of Hyacinthaceae from Algeria. *Plant evol*, Vol.285, P.117-187.
- Hammouche Y. (2014)** Etude biosystématique et phylogénétique de *Scilles automnales* des genres *Prospero salisb* *Barnardia Lind.* et Hyacinthoides Rothm. (Asparagaceae).
- Iserin P. (2001):** Larousse encyclopédie des plantes médicinales : identification, préparation, soins. Ed: Larousse .VUEF, PARIS. Pp: 283.
- JAHIER J., CHEVRE A. M., DELOURME R., EBER F., TANGAY A. M., 1992:** Techniques de cytogénétique végétale. Editions de l'INRA, Paris 184 P.
- Krenn L., Kopp B., Speta F., Kubelka W. (2001)** Chemotaxonomische Untersuchung der Gattung *Charybdis* Speta (Urginoideae, Hyacinthaceae). *Stapfia* 75, Landesmuseums. Neue Folge 164:101-120.
- Krenn L. (2004)** *Urginea*. In Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis (Bruchhausen, F., ed.) : 1030-1050.
- Lebreton, P., Jay, M., Voirin, B. (1967).** Sur l'analyse qualitative et quantitative des flavonoïdes. *Chim. Anal. Fr.*, 49(7): 375-383.
- Lemondé A et Clément D. (1983).** Biologie cellulaire et moléculaire. Presses Université. Paris : Laval. Pp : 396-398.
- Lysak M. A., Berr A., Pecinka A., Schmidt R., McBreen K., Schubert I. (2006)** Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related Brassicaceae species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 5224-5229.
- Macheix J.J., Fleuriet A. et Jay-Allemand C.(2005).** Les composés phénoliques : un exemple de métabolites secondaires d'importance économiques. Ed. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes. Pp : 192.
- Macheix J.J., Fleuriet A., Jay-Allemand C., (2005).** Les composés phénoliques des

végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importante économique.

Lausanne, Suisse. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes. 1p.

**Maire R. (1958)** Flore de l'Afrique du nord. Vol.5. Ed : Le chevalier, Paris.

**Parker J. S., Lozano R., Taylor S., Ruiz Rejón M. (1991)** Chromosomal structure of populations of *Scilla autumnalis* in the Iberian Peninsula. *Heredity* 67: 287-297.

**Pfossler M., Speta F. (1999)** Phylogenetics of Hyacinthaceae based on plastid DNA sequences. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 86: 852-875.

**Quézel P., Santa S. (1962)** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Edition du C.N.R.S. Paris. Tome 2, 1170 p.

**Schubert I. (2007)** Chromosome evolution. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 109-115.

**Speta F. (1979)** Karyological investigations in *Scilla* in regard to their importance for taxonomy. *Webbia* 34 (1): 419-431.

**Speta F. (1982)** Die gattungen *Scilla* L s.str. und *Prospero* Salisb. Im. Pannonischen Raum. Veröff. Intern. Arbeitsgem. *Clussius Forschung Güssing* 5: 1-19.

**Speta F. (2000)** Beitrag zur Kenntnis der Gattung *Prospero* Salisb (Hyacinthaceae) auf der griechischen Insel Kreta. *Linzer Biol. Beitr.* 32: 1323-1326.

**Vaughan H. E., Taylor S., Parker J. S. (1997)** The ten cytological races of the *Scilla autumnalis* species complex. *Heredity* 73: 371-379.

**Watson L., Dallwitz M. J. (2002)** The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and informations. Retrieval from:

<http://www.biodiversity.uno.edu/delta>.

**Weiss-Schneeweiss H., Schneeweiss G. M. (2013)** Karyotype diversity and evolutionary trends in angiosperms. in *Plant Genome Diversity. Volume 2. Physical Structure, Behavior and Evolution of Plant Genomes*. Edited by Leitch I. J., Greilhuber J., Doležal J., Wendel J. F. *Springer-Verlag: Wien*: 209-230.

**WINKEL B.S.J., 2004:** Metabolic channeling in plants. *Annual Review in plant biology*.

**Yi, P., Johnson, A.N., Han, Z., Wu, J., Olson, E.N. (2008).** Heterotrimeric G proteins regulate a noncanonical function of septate junction proteins to maintain cardiac integrity

in *Drosophila*. 15(5): Pp : 704--713.

### Annexe 1 : Matrices globales des mesures morphométriques des deux espèces étudiées.

**Tableau 1 :** Matrice globale des données mesurées sur *Prospero fallax*.

Caractères individus	A	B	C	D	E	F	G	H
1	5,7	0,1	8	1,6	12,3	2,2	1,8	10
2	6,1	0,1	8	1,9	14,2	1,8	1,6	9
3	7	0,2	3	1,1	14	2,9	1,2	12
4	3,7	0,1	5	1,5	10,6	1,7	1,3	8
5	4	0,1	6	1,8	13,2	2	1	9
6	6,8	0,2	6	1,8	9,5	2,5	0,9	9
7	2,1	0,1	5	1,2	12,4	2	1,5	10
8	7,2	0,2	3	1,3	17	2,5	1,3	14
9	5,1	0,1	4	1	13,7	2,6	0,8	9
10	3,6	0,1	4	1,2	15,9	2,8	0,9	10

**Tableau 2 :** Matrice globale des données mesurées sur *Hyacinthoides lingulata*.

Caractères individus	A	B	C	D	E	F	G	H
1	13,8	2,3	6	1,8	20,2	5,8	0,4	24
2	18,2	1,7	4	0,8	23,8	2	0,6	7
3	16	1,5	7	1	18,9	3,9	0,7	11
4	14,9	1,9	5	0,9	17	1,8	0,5	8
5	11,5	0,9	5	1	13,3	2,2	0,2	15
6	11,6	1,1	6	0,8	14,8	2,8	0,4	22
7	20	1,5	4	0,9	27,2	2	0,5	7
8	18,9	1,8	3	0,8	25,9	2,6	0,3	9
9	14,7	1,9	5	1,5	18,5	2,5	0,4	14
10	14	1	5	1,1	18,6	2	0,7	10

**Tableau 3:** Moyennes  $\pm$  écarts types des caractères mesurés chez les deux espèces étudiées

Espèce Caractère	Moyennes $\pm$ écarts types des caractères	
	<i>P.fallax</i>	<i>H.lingulata</i>
<b>A</b>	5,13 $\pm$ 1,63	15,36 $\pm$ 2,77
<b>B</b>	0,13 $\pm$ 0,05	1,56 $\pm$ 0,43
<b>C</b>	5,2 $\pm$ 1,72	5 $\pm$ 1,1
<b>D</b>	1,44 $\pm$ 0,31	1,06 $\pm$ 0,32
<b>E</b>	13,28 $\pm$ 2,13	19,82 $\pm$ 4,33
<b>F</b>	2,3 $\pm$ 0,4	2,76 $\pm$ 1,17
<b>G</b>	1,23 $\pm$ 0,32	0,47 $\pm$ 0,16
<b>H</b>	10 $\pm$ 1,67	12,7 $\pm$ 5,76

**Annexe 2 : solutions utilisées pour l'étude cytogénétique de *Prospero fallax*.**

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

90 ml d'acide acétique + 10 ml d'eau distillée

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

70ml d'éthanol + 30 ml d'eau distillée

- Préparation de la solution de  $\alpha$ -Bromonaftalène :

5 à 6 gouttes de  $\alpha$ -bromonaftalène dans un pilulier d'eau de robinet, agité très bien jusqu'à ce que la solution devienne opaque.

- Préparation de la solution d'HCl 1N :

10 ml d'HCl 10N + 90 ml d'eau distillée

**Annexe 3 : extraction des 3 classes de flavonoïdes par hydrolyse acide**

- Préparation de la solution d'HCl 2N :

20 ml d'HCl 10N + 80 ml d'eau distillée

**Annexe 4 : Teneurs absolues en différentes classes de flavonoïdes des feuilles et des bulbes des deux espèces étudiées.**

**Tableau 4:** Moyennes des teneurs absolues en anthocyanes des feuilles des deux espèces étudiées.

individu espèce	1	2	3	moyenne
P. fallax	0,1248	0.1248	0.1249	0.1248
H. lingulata	0.1674	0.2385	0.1674	0.1911

**Tableau 5:** Moyennes des teneurs absolues en c-glycosides des feuilles des deux espèces étudiées.

individu espèce	1	2	3	moyenne
P. fallax	0.1019	0.1019	0.1019	0.1019
H. lingulata	0.0138	0.0184	0.0138	0.0153

**Tableau 6:** Moyennes des teneurs absolues en aglycones flavoniques des feuilles des deux espèces étudiées.

individu espèce	1	2	3	moyenne
P. fallax	0.0910	0.0910	0.0910	0.0910
H. lingulata	0.1762	0.1743	0.1762	0.1755

**Tableau 7:** Moyennes des teneurs absolues en anthocyanes des bulbes des deux espèces étudiées.

individu espèce	1	2	3	moyenne
P. fallax	0.1383	0.1383	0.1384	0.1383
H. lingulata	0.3294	0.3294	0.3294	0.3294

**Tableau 8:** Moyennes des teneurs absolues en c-glycosides des bulbes des deux espèces étudiées.

individu espèce	1	2	3	moyenne
P. fallax	0.0083	0.0083	0.0083	0.0083
H. lingulata	0.0018	0.0018	0.0018	0.0018

**Tableau 9:** Moyennes des teneurs absolues en aglycones flavoniques des bulbes des deux espèces étudiées.

individu espèce	1	2	3	moyenne
P. fallax	0.056	0.056	0.056	0.056
H. lingulata	0.0338	0.0338	0.0338	0.0338

**Annexe 5 : Résultats des tests bilatéraux à  $t=0,05$ .**

**Tableau 10 :** Résultat du test bilatéral des caractères morphologiques des deux espèces *P.fallax* et *H.lingulata*.

caractères	P	Seuil de signification	P ( $T \leq t$ ) bilatéral
A		0,05	0,03
B		0,05	0,02
C		0,05	0,56
D		0,05	0,46
E		0,05	0,01
F		0,05	0,88
G		0,05	0,01
H		0,05	0,02

**Tableau 11** : Résultat du test bilatéral des teneurs absolues en anthocyanes, C-glycosides et aglycones entre les feuilles et les bulbes de *P. fallax*.

<i>P.fallax</i> \ P	Seuil de signification	P (T ≤ t) bilatéral
Anthocyanes	0,05	0,01
C-glycosides	0,05	0,04
Aglycones	0,05	0,02

**Tableau 12** : Résultat du test bilatéral des teneurs absolues en anthocyanes, C-glycosides et aglycones entre les feuilles et les bulbes de *H. lingulata*.

<i>H.lingulata</i> \ P	Seuil de signification	P (T ≤ t) bilatéral
Anthocyanes	0,05	0,56
C-glycosides	0,05	0,01
Aglycones	0,05	0,03

**Tableau 13** : Résultat du test bilatéral des teneurs absolues en anthocyanes, C-glycosides et aglycones entre les feuilles des deux espèces *P.fallax* et *H.lingulata*.

feuilles \ P	Seuil de signification	P (T ≤ t) bilatéral
Anthocyanes	0,05	0,02
C-glycosides	0,05	0,01
Aglycones	0,05	0,02

**Tableau 14** : Résultat du test bilatéral des teneurs absolues en anthocyanes, C-glycosides et aglycones entre les bulbes des deux espèces *P.fallax* et *H.lingulata*.

<b>Bulbes \ P</b>	<b>Seuil de signification</b>	<b>P (T ≤ t) bilatéral</b>
<b>Anthocyanes</b>	0,05	0,01
<b>C-glycosides</b>	0,05	0,1
<b>Aglycones</b>	0,05	0,04

## Résumé :

Le but de cette étude est d'évaluer les différences morphométriques, caryologiques et biochimiques de deux espèces de scilles, à savoir *Prospero fallax* et *Hyacinthoides lingulata*, échantillonnées dans la région de Kabylie (Tizi Rached).

La comparaison des flavonoïdes extraits a révélé des différences significatives entre les teneurs absolues des feuilles par rapport à celles des bulbes chez les deux espèces. Nous avons remarqué aussi des différences entre les teneurs absolues en flavonoïdes en comparant les feuilles et bulbes de *Hyacinthoides lingulata* à *Prospero fallax*.

Suite à l'essai d'établissement du caryotype de *Prospero fallax*, nous avons dénombré, tant bien que mal, un nombre approximatif de  $2n=25$  chromosomes. Nous avons pu assigner ce résultat à ceux trouvés lors d'une étude ultérieure qui confirme la polyploïdie de *Prospero autumnal* avec un nombre de  $2n=28$  chromosomes.

**Mots clés :** *Prospero fallax*, *Hyacinthoides lingulata*, Flavonoïdes, chromosomes, Kabylie.

## Abstract:

The purpose of this study is to estimate the morphometric, caryologic and biochemical differences between two species of spring squills, worth knowing *Prospero fallax* and *Hyacinthoides lingulata*, sampled in the region of Kabylia (Tizi Rached).

The comparison of the extracted flavonoids revealed significant differences between the contents absolved from leaves compared with those of the bulbs to both species. We also noticed differences between the contents absolved in flavonoids by comparing leaves and bulbs of *Hyacinthoides lingulata* to *Prospero fallax*.

After the approval of establishment of *Prospero fallax*'s karyotype, we counted, with great difficulty, an approximate number of  $2n=25$  chromosomes. We were able to assign this result to those found during a later study which confirms *Prospero autumnal*'s polyploidy with a number of  $2n=28$  chromosomes.

**Keywords:** *Prospero fallax*, *Hyacinthoides lingulata*, Flavonoids, chromosomes, Kabylia.